

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie*

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

*Etude de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds
de souches d'entérobactéries
isolées de l'environnement hospitalier*

Présenté par

M^{lle} ZENATI Karima

Devant le jury composé de :

M. BENALLAOUA S.	Professeur, UAMB	Président
M. TOUATI A.	Docteur MCA, UAMB	Rapporteur
M^{me} BEJOU F.	Docteur MCA, UAMB	Examineur
M. IGUEROUADA M.	Docteur MCA, UAMB	Examineur

2010

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de mémoire, M^r A. TOUATI, maître de conférences à l'université A. Mira de Bejaia. Il a su à la fois me laisser toute l'initiative et rester disponible pour me faire profiter de l'étendu de son savoir et la profondeur de ses idées pour mieux orienter ce travail. Je lui dois beaucoup pour les encouragements et les conseils qu'il m'a prodigué.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur S. BENALLAOUA qui m'a honoré en acceptant d'examiner ce mémoire et de présider mon jury.

Mes remerciements les plus profonds s'adressent également à :

Madame F. BEJOU et Monsieur M. IGUEROUADA, maîtres de conférences à l'Université A. Mira de Bejaia pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à M^r YESSAD, responsable du laboratoire d'hygiène d'Amizour, M^r BOURAI, responsable du laboratoire d'analyse de l'hôpital Kheil Amrane ainsi qu'au Directeur de l'hôpital Frantz Fanon, M^r HAMISSI sans oublier le personnel de l'hôpital d'Amizour, en particulier M^r ZENATI, M^r ABDELLI et M^r YESSAD.

Un grand merci à M^r BELHADI, M^r et M^{me} RAMDANI pour leur précieuse aide. Qu'ils reçoivent l'expression de ma vive gratitude.

Je remercie également à travers ce travail M^{me} BOULILA, M^{me} GUAROUT, M^{lle} BELHAMICHE, M^r AJAOUD et M^r AMROUCHE.

Il m'ais enfin agréable de remercier mes amis en particulier Belmahdi et Yousfi et tous ceux qui m'ont aidé, encouragé et soutenu durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

***L**a mémoire de mon **Grand Père**, à qui je dois tout, tant le souvenir de ses conseils, de son soutien dans les moments importants de ma vie et de ses encouragements qui m'ont permis d'aller de l'avant et d'atteindre mes objectifs, aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.*

***M**es très chers **Parents**, ma **Grande Mère** et mes frères et Sœurs qui ont cru en moi, m'ont fait confiance, respectés mes choix, soutenus et encouragés dans mes études sans pour autant se plaindre de mon absence.*

La personne la plus adorable et la plus gentille « **DJELLALI** » qui ma beaucoup aidé, initié à la recherche, encouragé et surtout supporté tout le long de mon parcours. Je ne saurai jamais lui exprimer mes sincères et profonds remerciements.

A toute La promotion de **Microbiologie Appliquée** en particulier **M**ohamed et **K**hadija et à tout(es) mes ami(e)s et à ceux qui m'ont aidé et soutenus de près ou de loin : **K**akou,

Nabila sans oublier **S**amia et **S**ofiane

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction1

Synthèse bibliographique

I- Environnement hospitalier

I-1- Définition	3
I-2- Microorganismes de l'environnement hospitalier	3
I-3- Contamination de l'environnement par les microorganismes	4
I-3-1- Eau	4
I-3-2- Air	5
I-3-3- Surfaces	5
I-4- Surfaces de l'environnement hospitalier.....	6
I-4-1- Contamination des surfaces	6
I-4-2- Persistance des bactéries	7
I-4-3- Voies de transmission des microorganismes	9
I-4-4- Nettoyage des surfaces	11
I-5- Environnement hospitalier et infections nosocomiales.....	14

II-Résistance aux antibiotiques dans l'environnement hospitalier

II-1- Généralités	17
II-2- Résistance des souches environnementales.....	18
II-3- Propagation de la résistance	21
II-4- Etude de cas de souches BLSE isolées de l'environnement hospitalier rapportées par certains auteurs.....	22

III- Métaux lourds

III-1- Généralités sur les métaux lourds.....	27
III-2- Intérêts et utilisation des métaux lourds	28
III-2-1- Mercure	28
III-2-2- Cuivre.....	29
III-2-3- Zinc	29
III-2-4- Cadmium.....	30
III-2-5- Plomb	30
III-3- Résistance aux métaux lourds	31
III-3-1- Résistance par séquestration	32
III-3-2- Résistance par imperméabilité	34
III-3-3- Système d'efflux	34
III-3-4- Résistance par détoxification enzymatique	36

Matériel & Méthodes

I- Sites de prélèvement	39
II- Prélèvement.....	41
III- Isolement et purification.....	41
IV- Identification des entérobactéries	42
V- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	43
VI- Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	45
VI-1- DD-test.....	45
VI-2- DD-test sur gélose additionnée de cloxacilline.....	46
VII- PCR du gène <i>bla</i>	46
VIII- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	47
IX- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds.....	48
IX- 1- Préparation des solutions initiales en sels métalliques.....	48
IX-2- Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu solide	48
X- Transfert de la résistance par conjugaison.....	50

Résultats & Discussions

I- Isolement et identification.....	51
II- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	55
II-1- Sensibilité au CTX et CAZ.....	55
II-2- Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	56
II-2-1- DD-test	56
II-2-2- DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline	56
II-3- Sensibilité des souches BLSE aux antibiotiques	58
II-3-1- β -lactamines	58
II-3-2- Aminosides.....	59
II-3-3- Quinolones	61
II-3-4- Autres antibiotiques.....	62
II-4- Répartition des souches BLSE selon leur origine d'isolement	64
II-5- PCR du gène <i>bla</i>	66
II-6- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	67
III- Résistance des entérobactéries aux métaux lourds	69
III-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	69
III-2- Phénotypes de résistance aux métaux lourds	74
III-2-1- Métallotypes des entérobactéries productrices de BLSE.....	76
III-3- Corésistance des BLSE aux antibiotiques et aux métaux lourds	77
IV-Transfert de gènes de résistance par conjugaison	80
Conclusion	82
Références bibliographiques	85
Annexes	

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette	ERV	<i>Enterococcus</i> spp. Résistant à la Vancomycine
ADH	Arginine dé shydrogénase	Fe	Fer
Ag	Argent	FEP	Céfépime
Al	Aluminium	FOS	Fosfomycine
AMC	Amoxycilline- Clavulanate	FOX	Céfoxitine
AMK	Amikacine	Glu	Glucose
ATB	Antibiotiques	GM	Gentamicine
ATM	Aztréonam	H.I.C.A.C	Healthcare Infection Control Advisory Committee
Au	Or	Hg	Mercure
BLSE	β-Lactamase à Spectre Elargi	I	Intermédiaire
BMR	Bactéries Multirésistantes	Ind	Indole
BOP	Bloc Opératoire	IPM	Imipenème
C	Chloramphénicol	KAN	Kanamycine
C.D.C.P.	Centers for Disease Control and Prevention	Lac	Lactose
C2G	Céphalosporine de 2^{ème} Génération	LDC	Lysine déshydrogénase
C3G	Céphalosporine de 3^{ème} Génération	Man	Mannitol
C4G	Céphalosporine de 4^{ème} Génération	MF	Médecine Femme
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	MFS	Major Facilitator Superfamily
CAZ	Céftazidime	MH	Médecine Homme
Cc	Concentrations Critiques	mM	Milimolaire
CAAZ	Céftazidime-Clavulanate	Mn	Manganèse
CCTX	Céfotaxime-Clavulanate	Mob	Mobilité
Cd	Cadmium	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Methicillin
CDF	Cation Diffusion Facilitators	NAL	Nalidixique Acide
CF	Chirurgie Femme	ND	Non Déterminé
CFEP	Céfépime-Clavulanate	Ni	Nickel
CHU	Centre Hospitalier Universitaire	Nit	Nitrate
CIP	Ciprofloxacine	NOR	Norfloxacine
Cit	Citrate	ODC	Ornithine décarboxylase
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice	OFX	Ofloxacine
Co	Cobalt	ORL F	ORL Femme
COF	Chirurgie Orthopédique Femme	Pb	Plomb
COH	Chirurgie Orthopédique Homme	PCR	Polymerase Chain Reaction
CPO	Cefpirome	Péd	Pédiatrie
CS	Colistine	PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
CTX	Céfotaxime	PIP	Pipéracilline
CTX-M	Céfotaximase	R	Résistant
Cu	Cuivre	Réa	Réanimation
CVF	Chirurgie Viscérale Femme	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
CVH	Chirurgie Viscérale Homme		

RIF	Rifampicine	Tm	Melting Temperature
RM	Rouge de Méthyle	TOB	Tobramycine
RND	Resistance-Nodulation-Cell-Division	TSB	Trypticase Soja Broth
S	Sensible	TZP	Pipéracilline- Tazobactam
SXT	Thriméthoprine-Sulfaméthoxazole	UFC/ml	Unité Formant Colonie/Millilitre
T	Témoin	Uré	Urée
TC P-739	Transconjuguant Proteus-Souche 739	VP	Voges Proskauer
TCC	Ticarcilline - Clavulanate	Zn	Zinc
TET	Tétracycline	V	Volume
TIC	Ticarcilline	µg	Microgramme

Liste des tableaux

Tableau I : Persistance des bactéries d'origine clinique sur les surfaces sèches inanimées	8
Tableau II : Spectres d'activité de certains désinfectants	13
Tableau III : Exemples de mécanismes de résistance aux antibiotiques	19
Tableau IV : Sites de prélèvement	39
Tableau V : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital d'Amizour	40
Tableau VI : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital Khelil Amrane	40
Tableau VII : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital Frantz Fanon.....	41
Tableau VIII : Antibiotiques testés.....	44
Tableau IX : Amorces utilisées pour la PCR du gène <i>bla</i>	46
Tableau X : Programme PCR.....	47
Tableau XI : Préparation des concentrations d'antibiotiques	47
Tableau XII : Concentrations critiques exprimant une résistance ou une sensibilité aux métaux lourds	48
Tableau XIII : Préparation des concentrations en chlorure de mercure	49
Tableau XIV : Les différentes concentrations de sels métalliques	49
Tableau XV : Répartition des prélèvements par hôpital et par services	51
Tableau XVI : Nombre d'entérobactéries isolées par services au niveau de chaque hôpital	52
Tableau XVII : Distribution des souches par sites de prélèvement.....	53
Tableau XVIII : Antibiogramme des souches d'entérobactéries isolées des surfaces de l'environnement hospitalier.....	55
Tableau XIX : Résultats de la recherche des BLSE.....	56
Tableau XX : Résultats des galeries API20E.....	57
Tableau XXI : Phénotypes de résistance aux β -lactamines	58
Tableau XXII : Phénotypes de résistance aux aminosides	60
Tableau XXIII : Phénotypes de résistance aux quinolones	62
Tableau XXIV : Répartition des souches résistantes par hôpital et par service	65
Tableau XXV : Résultats de l'amplification du gène <i>bla</i>	66
Tableau XXVI : Concentrations minimales inhibitrices des souches BLSE vis-à-vis des β -lactamines	68
Tableau XXVII : Concentrations minimales inhibitrices des souches BLSE vis-à-vis des métaux lourds	69
Tableau XXVIII : Résistance des souches BLSE aux métaux lourds	75

Tableau XXIX : Métallotypes de résistance des souches BLSE	76
Tableau XXX : Phénotypes de résistance des BLSE aux antibiotiques et aux métaux lourds ...	77
Tableau XXXI : Mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds	78
Tableau XXXII : Choix des souches pour l'étude du transfert des gènes de résistance.....	80
Tableau XXXIII : Diamètres des zones d'inhibition obtenus pour le tansconjuguant P-739 vis-à-vis des antibiotiques	81

Liste des tableaux annexes

Tableau I : Aspect des colonies d'entérobactéries sur milieux de culture
Tableau II : Résultats des tests biochimiques d'identification des entérobactéries
Tableau III : Lecture et interprétation des résultats de galerie API20E
Tableau IV : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital d'Amizour
Tableau V : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital Frantz Fanon
Tableau VI : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital Khelil Amrane

Liste des figures

Figure 01 : Modes de transmission des infections hospitalières	10
Figure 02 : Gamme de concentration en métaux lourds et réponses biologiques associées	31
Figure 03 : Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries	33
Figure 04 : Mécanismes de résistance au cuivre chez <i>E. coli</i>	36
Figure 05 : Mécanismes de résistance au mercure.....	37
Figure 06 : Schéma de détection des BLSE	45
Figure 07 : Répartition des souches d'entérobactéries par services.....	52
Figure 08 : Image de synergie	56
Figure 09 : Taux de résistance des souches BLSE aux β -lactamines	59
Figure 10 : Taux de résistance des souches BLSE aux aminosides	60
Figure 11 : Taux de résistance des souches BLSE aux quinolones	61
Figure 12 : Taux de résistance des souches BLSE aux autres antibiotiques.....	63
Figure 13 : Concentrations minimales inhibitrices des entérobactéries vis-à-vis des sels de métaux lourds	70
Figure 14 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le chlorure de mercure	71
Figure 15 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de cuivre	71
Figure 16 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de zinc.....	72
Figure 17 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par l'acétate de plomb.....	73
Figure 18 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de cadmium	73
Figure 19 : Taux de résistance des souches BLSE vis-à-vis des métaux lourds.....	75
Figure 20 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la cosélection de la résistance aux métaux et aux antibiotiques.....	79
Figure 21 : Croissance du transconjuguant P-739.....	80
Figure 22 : Antibiogramme de <i>Proteus mirabilis</i> avant et après conjugaison	81

Liste des figures annexes

Figure 01 : Aspects des colonies du groupe KES (<i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> et <i>Enterobacter</i>) sur URIsselect 4	
Figure 02 : Exemple de résultat d'identification par galerie API20E	

Introduction

Introduction

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique de microorganismes qui peuvent avoir une signification clinique, cette contamination varie qualitativement et quantitativement d'un établissement à un autre, au sein du même établissement en fonction des services, des patients, des soins pratiqués et de la capacité de survie des microorganismes dans l'environnement (Cavallo et *al.*, 2002). Les poussières provenant de diverses surfaces contiennent des microorganismes qui peuvent être transmis aux patients par les mains. L'utilisation massive des antibiotiques dans un service donné est associée à une résistance accrue des microorganismes environnementaux à ces mêmes antibiotiques (Dancer et *al.*, 2006).

Depuis les années 1980, de nombreuses épidémies nosocomiales dues aux entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ont été rapportées dans le monde. Le réservoir de ces bactéries résistantes est le tractus gastro-intestinal des patients et les voies de transmission croisées qui se produisent principalement *via* les mains contaminées du personnel de santé (Kac et *al.*, 2004).

L'émergence des bactéries multirésistantes (BMR) au sein d'un établissement est un phénomène multifactoriel (sévérité de l'état clinique des malades, environnement, non-respect ou absence des protocoles visant à maîtriser la transmission croisée, absence d'une politique rationnelle de prescription des anti-infectieux, ...). L'hygiène hospitalière constitue le deuxième pilier indissociable de la stratégie à mettre en œuvre dans la maîtrise de la diffusion des BMR. L'application systématique des bonnes pratiques visant à prévenir la transmission croisée est indispensable (Levent et *al.*, 2005).

La maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques et le bon usage de ces derniers font maintenant l'objet de nombreuses recommandations. La propagation de ces germes dans et entre les établissements de santé, mais également en milieu communautaire, représente un défi à relever. La relation vraisemblable entre résistance et consommation élevée d'antibiotiques d'un côté, l'application insuffisante des précautions d'hygiène visant à limiter la transmission croisée des BMR de l'autre, favorise ce phénomène (Levent et *al.*, 2005).

L'exposition continue des populations microbiennes aux antibiotiques, aux métaux lourds ou aux autres agents antimicrobiens peut sélectionner des souches résistantes, ce qui crée une pression de sélection dans l'environnement qui conduit à des mutations chez les

microorganismes, leur permettant de mieux survivre et se multiplier (De Vicente et *al.*, 1990 ; Spain et Alm, 2003 ; Abskharon et *al.*, 2008).

Les situations où une source environnementale (air, eau, matériel, produits, surfaces, etc.) peut contaminer un patient hospitalisé, puis être à l'origine d'une infection, sont potentiellement nombreuses et variées (Fabry, 2000). Toutefois, l'environnement inerte est fréquemment retrouvé contaminé à partir de réservoirs vivants. Certaines études évoquent le rôle potentiel de l'environnement dans la survenue des infections sur un mode épidémique du fait de la contamination des surfaces dans le proche environnement d'un patient infecté ou colonisé (Bertrou et *al.*, 2000).

Les preuves scientifiques de la responsabilité de la contamination de l'environnement dans les infections nosocomiales restent souvent difficiles à démontrer car on ne sait pas si cette contamination est la cause ou la conséquence de l'infection. Toutefois, certains travaux ont rapporté l'incrimination des réservoirs environnementaux dans la genèse de ces infections (D'agata et *al.*, 1999 ; Rampling et *al.*, 2001 ; Zeana et *al.*, 2003 ; Kac et *al.*, 2004 ; Carling et *al.*, 2008). Ce constat a été également observé en Algérie par Touati et *al.*, (2007a) et par Abid et *al.* (2007).

Cette présente étude s'inscrit dans le cadre des activités de recherche du laboratoire de microbiologie appliquée sur les phénomènes de résistance aux antibiotiques. Sachant que très peu de travaux ont été réalisés sur la contamination des surfaces de l'environnement hospitalier par des entérobactéries productrices de BLSE, il est donc important d'évaluer le degré de cette contamination et d'étudier la résistance de ces souches vis-à-vis des antibiotiques et des métaux lourds. Cette étude est menée au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaïa (Amizour, Khelil Amrane et Frantz Fanon). Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Isolement et identification des entérobactéries à partir des surfaces de l'environnement hospitalier ;
- Etude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis du céfotaxime et du céftazidime ;
- Détermination du mécanisme de résistance aux antibiotiques ;
- Caractérisation génétique des BLSE produites ;
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de certaines β -lactamines ;
- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds et détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu solide ;
- Etude de la capacité de transfert de la résistance par conjugaison.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Environnement hospitalier

I-1- Définition.....	3
I-2- Microorganismes de l'environnement hospitalier.....	3
I-3- Contamination de l'environnement par les microorganismes.....	4
I-3-1- Eau.....	4
I-3-2- Air	5
I-3-3- Surfaces	5
I-4- Surfaces de l'environnement hospitalier	6
I-4-1- Contamination des surfaces	6
I-4-2- Persistance des bactéries	7
I-4-3- Voies de transmission des microorganismes.....	9
I-4-4- Nettoyage des surfaces	11
I-5- Environnement hospitalier et infections nosocomiales	14

I- Environnement hospitalier

I-1-Définition

L'environnement hospitalier est constitué de l'ensemble des éléments liquides, solides ou gazeux qui environnent ou entrent en contact avec les patients, les visiteurs ou le personnel dans une structure hospitalière. Entrant dans cette définition l'air (médical ou atmosphérique), les surfaces inertes (mobilier, linge, instrumentation,...), les surfaces vivantes (les mains du personnel), les eaux (de réseau, de piscine et de dialyse), les solutés (préparations injectables, solutions d'antiseptiques, pommades,...) et l'alimentation (Le Heurt et *al.*, 1995 ; Bosi, 2000).

L'environnement hospitalier est largement contaminé par des microorganismes d'origine humaine ou environnementale. Cette contamination varie qualitativement et quantitativement dans le temps et d'un établissement à un autre. Au sein du même établissement, elle varie en fonction des services, des patients, des soins et des techniques pratiquées (Barbut et Neyme, 2006).

I-2- Microorganismes de l'environnement hospitalier

Les microorganismes présents dans l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, moisissures, virus et parasites) et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme. La capacité de créer une infection découle d'une combinaison de facteurs associant le niveau d'expression des facteurs de virulence du microorganisme, sa concentration, le mode de contamination et la réceptivité de l'hôte (Cavallo et *al.*, 2002).

La flore bactérienne saprophyte est composée de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus non aureus*, *Pseudomonas* et divers bacilles à Gram négatif. La flore commensale est composée de germes d'origine humaine comme par exemple *Enterococcus*, les entérobactéries ou encore *Staphylococcus aureus* (Bertrou et *al.*, 2000).

Parmi les autres microorganismes impliqués dans les infections, les levures et surtout les champignons filamenteux (*Aspergillus* sp.) sont très bien adaptés à la survie et à la multiplication dans l'environnement. Les virus peuvent également être présents dans l'environnement, ils proviennent souvent d'un réservoir humain constitué par les patients et le personnel hospitalier. Leur importance est certainement sous-estimée car leur recherche est techniquement difficile à réaliser. Ceux-ci sont surtout les virus à localisation rhinopharyngée,

pulmonaire ou cutanée pouvant être incriminés dans les infections aéroportées (certains virus responsables d'infections en pédiatrie, comme les rotavirus) (Cavallo et *al.*, 2002).

Les formes infectantes de certains parasites sont éliminées en grande quantité dans la nature à partir des hôtes parasités. C'est le cas notamment des kystes d'amibes, de *Giardia intestinalis* ou d'autres parasites. De plus, les amibes libres présentes dans les réseaux d'eau sont susceptibles d'héberger et de favoriser la survie et la multiplication de *Legionella* sp. La viabilité de ces parasites dans les milieux extérieurs est prolongée (Cavallo et *al.*, 2002).

D'après le C.D.C.P. « Centers for Disease Control and Prevention » et H.I.C.A.C « Healthcare Infection Control Advisory Committee » (2003), le nombre et les types de microorganismes présents sur les surfaces de l'environnement sont influencés par le nombre de personnes présentes dans l'environnement, l'activité, le taux d'humidité, la présence de matériel capable de supporter la croissance microbienne, le taux de microorganismes en suspension dans l'air et le type de surface et l'orientation (horizontale ou verticale) (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

I-3- Contamination de l'environnement par les microorganismes

L'environnement hospitalier est colonisé par de nombreux microorganismes qui constituent parfois de véritables niches écologiques. Cette contamination est diffuse et sa maîtrise, qui entraîne des procédures contraignantes, complexes et coûteuses, n'est le plus souvent que partielle et transitoire. Les microorganismes responsables d'infections nosocomiales ont un réservoir humain (flore digestive, respiratoire, cutanée, ...) ou environnemental (surface, air, eau, matériel). Les infections nosocomiales d'origine environnementale (exogène) sont plus rares. Elles peuvent être liées à une contamination à partir d'un réservoir situé dans l'environnement à proximité du malade (dispositifs médicaux, surfaces) ou à partir d'un réservoir situé dans l'environnement général de l'hôpital (eau, air) (Lucet et Astagneau, 1998).

I-3-1- Eau

L'eau joue fréquemment le rôle de réservoir émetteur et les exemples les plus frappants sont constitués par la présence de *Legionella* dans les réservoirs d'eau chaude ainsi que la colonisation quasi permanente des siphons d'installation sanitaire par *Pseudomonas aeruginosa*. L'eau peut aussi jouer le rôle de transmetteur par la libération de microorganismes. A l'intérieur de l'établissement hospitalier, les microorganismes en quantité

faible peuvent proliférer au niveau des bras morts, des extrémités des canalisations, des brise-jets des robinets, des pommes de douche et dans les circuits d'eau chaude (Stout et Yu, 1997). Une contamination par voie rétrograde peut survenir au niveau des différents points d'usage et des dispositifs branchés sur le réseau (machines à laver les instruments, trompes à vide, ...) (Bertrou et *al.*, 2000).

I-3-2- Air

L'apport microbien des occupants d'un local et celui des réservoirs inertes (eau, surfaces, déchets) se surajoutent à la flore naturelle de l'air extérieur (microcoques, *Sarcina*, spores des champignons filamenteux, ...) (Bertrou et *al.*, 2000).

Les microorganismes de l'air sont véhiculés sur des supports de tailles variables : les poussières (10-100 μm), les squames cutanées (dans les services de grands brûlés), les gouttelettes ou les microgouttelettes de salive (10 à 1000 μm) émises lors de la toux, des éternuements et de la parole et les noyaux de condensation issus de ces gouttelettes (droplets nuclei de 2-5 μm). Les plus grosses particules sédimentent en quelques minutes alors que les plus petites (droplets nuclei) peuvent rester en suspension plusieurs heures, diffuser à distance et pénétrer par inhalation jusque dans les alvéoles pulmonaires des patients (Audurier et *al.*, 1998 ; Barbut et Neyme, 2006).

L'hôpital est un lieu privilégié, car c'est le lieu de rencontre des malades et des soignants avec les bactéries qu'ils hébergent. Il y a donc un danger potentiel de contamination de l'air par des bactéries pathogènes ; l'air intervient dans les conditions habituelles comme transporteur de bactéries et non pas comme source de bactéries (Audurier et *al.*, 1998).

En l'absence de turbulence aérienne, les germes se sédimentent spontanément, en quatre à cinq heures, lorsque l'air de la pièce est agité (ouverture de porte, ...) les germes sont remis en suspension. La durée de vie des bactéries est également variable suivant les espèces ; les bactéries à Gram négatif ont une durée de vie moindre que les bactéries à Gram positif (Mereghetti, 1998).

I-3-3- Surfaces

Les surfaces sont contaminées soit par contact ou par sédimentation des microorganismes présents dans l'air. La répartition de la contamination des surfaces se fait le plus souvent de manière hétérogène. L'adhérence des bactéries est possible selon l'état de la surface. Cette adhérence peut s'accompagner de la création d'un biofilm (Carpentier et Cerf, 1993). Du fait des conditions de croissance défavorables, certaines bactéries peuvent se

miniaturiser (bactéries naines) (Bertrou et *al.*, 2000) et sont alors difficiles à mettre en évidence dans les prélèvements (bactéries viables et non cultivables). D'autres bactéries peuvent prendre une forme sporulée (*Clostridium difficile*) (Lucet et Astangneau, 1998). Il a été montré par exemple, que l'environnement proche d'un patient porteur de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) peut se retrouver à son tour contaminé et servir de réservoir secondaire (Barbut et Neyme, 2006).

I-4- Surfaces de l'environnement hospitalier

Les surfaces peuvent être divisées en deux groupes

- Celles où le contact avec les mains est minime : les planchers et les plafonds.
- Celles dont les mains sont souvent en contact : poignées de porte, les ridelles, interrupteurs, les zones des murs autour des toilettes dans la chambre des patients, les bordures des rideaux, ...

Les surfaces de haut niveau de contact devraient être nettoyées et/ou désinfectées plus fréquemment que les surfaces de contact minime avec les mains (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

I-4-1- Contamination des surfaces

La surveillance de la contamination bactérienne des surfaces est étroitement liée à celle de l'air. Elle s'établit sur les mêmes zones à risque, et la contamination du sol dépend en partie de la contamination aérienne. En effet, la biocontamination des surfaces se fait par contact (chaussures, roues de chariot, ...), par rinçage ou par sédimentation des particules en suspension dans l'air (Mereghetti, 1998).

La contamination des surfaces a trois origines :

- L'air qui véhicule sous forme d'aérosols des amas bactériens qui sont capables de sédimenter et de coloniser le milieu. Ce mécanisme a été démontré à plusieurs reprises, c'est le cas du problème d'aérocontamination au bloc opératoire par *Aspergillus* apporté par des poussières de travaux dans des unités protégées (Bosi, 2000).
- Le contact des patients infectés par des bactéries multirésistantes avec des surfaces inertes les rendent généralement contaminées. Cette contamination peut persister des heures, voire des semaines sur des surfaces sèches. Le personnel médical, les travailleurs et d'autres patients peuvent être contaminés par contact direct avec ces

surfaces qui par la suite deviendront un réservoir de microorganismes dans l'hôpital (Rutala et Weber, 2001).

- L'eau qui contamine les surfaces et les dispositifs médicaux par rinçage (inoculation de mycobactéries à partir d'un matériel chirurgicale recontaminé par l'eau du robinet après désinfection) (Lucet et Astagneau, 1998).

Les taux élevés de transfert des patients entre les unités et entre les hôpitaux intensifient l'apparition de bactéries résistantes. Cependant, l'installation d'une barrière pour contenir la propagation d'organismes résistants est souvent peu pratique pour les hôpitaux présentant une grande mobilité des patients (Bisson et *al.*, 2002 ; Owens et Rice, 2006).

I-4-2- Persistance des bactéries

La survie des microorganismes dans l'environnement est de durée très variable, dépendant de différents facteurs comme la nature du germe, la température, le taux d'humidité, le type de surface et leur degré de salissure, en particulier leur teneur en matières organiques (Bertrou et *al.*, 2000).

Les microorganismes responsables des infections nosocomiales peuvent persister sur des surfaces sèches inanimées pendant plusieurs mois (tableau N° I) (Neely et Maley, 2000). Le séchage des surfaces exerce une action bactéricide significative, mais son efficacité dépend de la nature de l'organisme et des conditions de température, d'encrassement et d'humidité (Bloomfield et Scott, 1997).

Tableau N° I : Persistance des bactéries d'origine clinique sur les surfaces sèches inanimées
(Kramer et al., 2006)

Bactéries	Durée de persistance
<i>Acinetobacter</i> spp.	3 jours à 5 mois
<i>Bordetella pertussis</i>	3 à 5 jours
<i>Campylobacter jejuni</i>	Plus de 6 jours
<i>Clostridium difficile</i> (spores)	5 mois
<i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. trachomatis</i>	≤ 30 heures
<i>Chlamydia psittaci</i>	15 jours
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	7 jours à 6 mois
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1 à 8 jours
<i>Escherichia coli</i>	90 minutes à 16 mois
<i>Enterococcus</i> spp.	5 jours à 4 mois
<i>Haemophilus influenzae</i>	12 jours
<i>Helicobacter pylori</i>	≤ 90 minutes
<i>Klebsiella</i> spp.	2 heures à > 30 mois
<i>Listeria</i> spp.	1 jour à plusieurs mois
<i>Mycobacterium bovis</i>	> 2 mois
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 jour à 4 mois
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 à 3 jours
<i>Proteus vulgaris</i>	1 à 2 jours
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 heures à 16 mois
<i>Salmonella typhi</i>	6 heures à 4 semaines
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 jours à plus de 4 ans
<i>Salmonella</i> spp.	1 jour
<i>Serratia marcescens</i>	3 jours à 2 mois
<i>Shigella</i> spp.	2 jours à 5 mois
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluant SARM	7 jours à 7 mois
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 à 20 jours
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 jours à 6,5 mois
<i>Vibrio cholerae</i>	1 à 7 jours

Dans l'ensemble, les bactéries Gram négatives persistent plus longtemps dans les milieux humides que les bactéries Gram positives. La plupart des bactéries Gram positives telles que *Enterococcus* spp. (ERV), *Staphylococcus aureus* (SARM) ou *Streptococcus pyogenes* peuvent survivre pendant plusieurs mois (4 à 7 mois) sur des surfaces sèches. En général, il n'y pas de différences évidentes entre la survie des souches sensibles et multirésistantes (Neely et Maley, 2000).

De nombreuses espèces de bactéries Gram négatives telles que *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* ou *Shigella* spp. peuvent survivre sur des surfaces inanimées pendant plusieurs mois (5 semaines à 30 mois). Ces espèces se trouvent parmi les plus fréquemment isolées de patients présentant des

infections nosocomiales. D'autres espèces, telles que *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris* ou *Vibrio cholerae* subsistent seulement pour quelques jours (2 à 12 jours). Les mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) et les spores bactériennes (de *Clostridium difficile*) peuvent également survivre pendant plusieurs mois (2 à 5 mois) sur les surfaces (tableau N° I) (Kramer et al., 2006).

L'humidité améliore la persistance de la plupart des bactéries telles que *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou d'autres espèces pathogènes. Seul *Staphylococcus aureus* persiste plus longtemps à de faible taux d'humidité. Les basses températures (4°C à 6°C) améliorent également la persistance de la plupart des espèces bactériennes comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* (SARM), corynebactéries, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* et *Neisseria gonorrhoeae* (Kramer et al., 2006).

Certains travaux rapportent que le type de matériau n'a aucune influence sur la persistance (Wendt et al., 1997). Cependant, Pérez et al. (1990) et Neely (2000) ont décrit que la persistance sur le plastique est plus longue ; alors que, Webster et al. (2000) voient un avantage de survie sur l'acier. Wheeldon et al. (2008) ont rapporté qu'une mort complète des spores de *C. difficile* est observée après 24 à 48 h de contact avec divers alliages de cuivre. Une longue persistance a été décrite avec des inocula de taille importante en présence de protéines, de sérum, de crachats avec ou sans poussière (Kramer et al., 2006).

I-4-3- Voies de transmission des microorganismes

Dans un établissement de santé, les sources d'infection et de contamination sont souvent le personnel, les patients ou l'environnement inanimé. Les microorganismes peuvent être transmis de leur source à un nouvel hôte par contact direct ou indirect, par l'air ou par des vecteurs (figure 01).

- **Auto-infections :** Le malade peut s'infecter avec ses propres germes, soit *in situ*, soit à partir de l'environnement immédiat où il les a dispersés (surfaces de la peau, vêtements, lits). Les portes d'entrée sont les lésions des muqueuses et les lésions cutanées (Laveran, 1998).
- **Hétéro-infections :** La transmission des microorganismes de personnes à personnes (personnel ou sujet hospitalisé) s'effectue par contact, direct ou indirect, ou par voie aérienne (Laveran, 1998).

- **Xéno-infections** : Les agents pathogènes sont importés à l'hôpital par la population extra hospitalière (visiteur, personnel, malades) qui en sont atteint ou sont en incubation. Ils se transmettent par voie aérienne, par contact direct ou indirect (Laveran, 1998).
- **Exo-infections** : L'exo-infection est liée à des erreurs techniques amenant au contact des malades avec des germes pathogènes : stérilisation inefficace, filtre à air stérile fracturé, eau polluée. C'est le cas d'épidémie de *Legionella* propagée par le système de conditionnement d'air ou d'intoxications alimentaires provoquées par les aliments contaminés (Laveran, 1998).

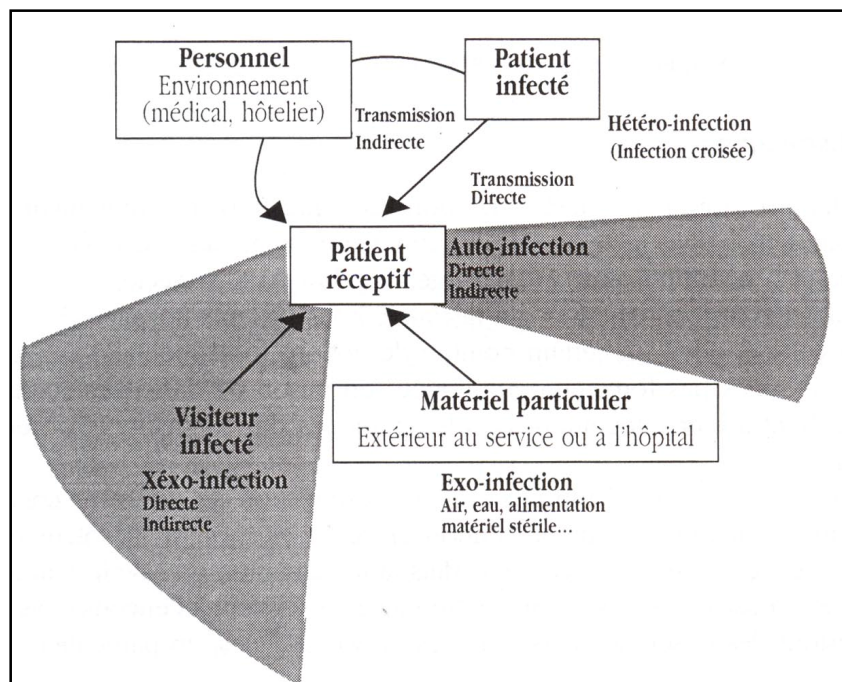


Figure 01 : Modes de transmission des infections hospitalières (Laveran, 1998).

Une transmission vectorielle est typique des pays dont les insectes, les arthropodes et autres parasites sont très répandus. Ceux-ci deviennent contaminés par contact avec des excréments ou sécrétions d'un patient infecté et transmettent les organismes infectieux mécaniquement à d'autres patients (Prüss et *al.*, 1999).

Le potentiel de contamination des surfaces de l'environnement qui contribuent à la transmission des microorganismes pathogènes dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment la capacité de ces microorganismes à survivre sur une variété de surfaces sèches,

la fréquence avec laquelle ils contaminent les surfaces souvent touchées par les patients et le personnel soignant (Boyce, 2007).

Une variété d'infections à transmission aérienne peut résulter chez les hôtes sensibles suite à une exposition à des microorganismes cliniques libérés dans l'air quand les réservoirs de l'environnement (sol, eau, poussière et les matières organiques en décomposition) sont perturbés. Une fois que ces microorganismes sont introduits à l'intérieur de l'établissement de santé par un certain nombre de véhicules (les humains, les courants d'air, l'eau, les matériaux de construction et les équipements), ils peuvent proliférer dans différentes niches écologiques et une fois remués, se retrouvent dans l'air et induisent des infections aéroportées (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

Le contact direct entre les patients ne se produit pas habituellement dans les établissements de santé, mais le personnel infecté peut toucher un patient et lui transmettre directement un grand nombre de microorganismes (Prüss et *al.*, 1999). Au cours de soins généraux et/ou d'un traitement médical, les mains du personnel soignant sont souvent en contact étroit avec les patients. Les mains du personnel sont donc les véhicules les plus fréquents des infections nosocomiales. La transmission par cette voie est beaucoup plus fréquente que la transmission vectorielle par l'air ou par contact direct ou indirect (Bhalla et *al.*, 2004).

La voie de transmission la plus fréquente est le contact indirect. Les patients infectés touchent et contaminent les objets, les instruments ou les surfaces. Un contact ultérieur de ces derniers avec un autre patient est susceptible de contaminer la deuxième personne qui peut alors développer une infection (Prüss et *al.*, 1999).

I-4-4- Nettoyage des surfaces

Le nettoyage est le processus d'élimination des corps étrangers d'une surface ou d'un objet, il implique à la fois des procédés mécaniques et l'utilisation de détergents avec de l'eau. Le nettoyage seul peut diminuer la charge microbienne sur une surface et, s'il est utilisé en association avec un désinfectant, conduit à la réduction significative de la charge microbienne en un temps plus court (Hota, 2004).

Bien qu'il soit largement admis que le nettoyage des surfaces et la désinfection de l'environnement du patient sont des éléments importants dans les établissements de santé,

l'évaluation de ces activités n'est pas prise en considération dans plusieurs hôpitaux. Le centre de contrôle des maladies et la prévention recommande qu'une « attention particulière soit accordée au nettoyage et la désinfection des surfaces de contact des patients de haut niveau dans les établissements de santé » (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

La plupart des surfaces ont seulement besoin d'être nettoyer avec de l'eau et du savon ou un désinfectant/détergent, selon la nature, le type et le degré de contamination de la surface. La fréquence et les méthodes de nettoyage et de désinfection varient selon la position géographique de l'établissement de santé, le type de surface à nettoyer et le type de sol présent (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

Le nettoyage a deux fonctions principales : d'une part, non microbiologique, améliore ou rétablit l'aspect, maintien la fonction et évite toute détérioration de la surface et d'autre part, microbiologique, afin de réduire le nombre de microorganismes présents ainsi que toutes les substances qui favorisent leur croissance ou qui peuvent diminuer l'efficacité du procédé de désinfection/stérilisation (Dancer, 2004).

Il existe deux grandes catégories de nettoyage ; la stérilisation qui permet de détruire toute vie microbienne sur un objet ou sur une surface et qui est obtenue par l'utilisation de la chaleur, de la pression ou des méthodes chimiques et la désinfection qui élimine la plupart des microorganismes, à l'exclusion des spores bactériennes, elle implique généralement l'utilisation d'agents chimiques (Hota, 2004). Le degré de destruction des microorganismes dépend de leur sensibilité aux désinfectants chimiques (tableau N° II). La désinfection de haut niveau implique l'élimination de tout les microorganismes et la plupart des spores, la désinfection de niveau intermédiaire conduit à la destruction de tous les microorganismes mais pas les spores et la désinfection de bas niveau ne tuera pas de manière fiable les mycobactéries ou les spores (Russell, 1998).

Tableau N° II : Spectres d'activité de certains désinfectants (Darbord, 1998)

Produits	Bactéricides		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Fongicides		Virucides	
	Gram+ <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Gram- <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i>		Spores bactériennes	Levures Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés
Peroxydes	+	+	+	±	+	+	+
Halogènes (chlorés, iodés)	+	+	+	±	+	+	+
Aldéhydes (formiques, glutariques)	+	+	+	+	+	+	+
Alcools	+	+	-	-	±	±	+
Acides et bases fortes	±	±	-	-	±	±	±
Organomercurels	±	±	-	-	±	±	±
Phénols Tensioactifs (cationiques)	+	+	+	±	+	+	+
	+	±	-	-	+	±	+
Chlorhexidine	+	+	±	-	+	-	+
Huiles essentielles	±	±	-	-	±	-	±

Le degré de désinfection est affecté par un certain nombre de facteurs dont chacun peut annuler ou limiter l'efficacité du processus. Ces facteurs sont le nettoyage préalable des objets, la charge organique et inorganique, le type et le niveau de contamination microbienne, la concentration, le temps de l'exposition au germicide, la nature de l'objet (crevasses, charnières), la température et le pH du processus de désinfection (Rutala et Weber, 1999).

Les surfaces doivent être nettoyées et désinfectées quotidiennement ou plusieurs fois par jour dans certains locaux. Deux techniques sont généralement proposées :

- Soit un « bionettoyage en trois temps » qui impose une étape de nettoyage utilisant un détergent, une étape de rinçage à l'eau claire suivie de l'application d'un désinfectant ;
- Soit le « bionettoyage en un temps » avec un produit dit détergent-désinfectant qui s'utilise en une seule application (Rouillon et *al.*, 2006).

Dans les hôpitaux, les chambres des patients doivent subir un «nettoyage terminal » après la sortie du patient de l'hôpital. Pendant ce nettoyage, les surfaces non critiques de l'environnement inanimé sont soigneusement nettoyées à l'aide d'un désinfectant, généralement à base d'ammoniums quaternaires ou de composés phénoliques (Owens et Rice, 2006)

Dans le milieu hospitalier, les isolats cliniques sont moins sensibles à de nombreux désinfectants couramment utilisés que le sont d'autres isolats. Les bactéries Gram négatives sont généralement plus résistantes que les bactéries Gram positives tels que les staphylocoques et les entérocoques (Russell, 1998). La rotation ou l'alternance des produits désinfectants consiste à utiliser successivement pour des périodes déterminées des principes actifs agissant par des mécanismes différents sur les espèces microbiennes à éliminer. Il s'agit bien de changer le produit mais aussi le principe actif. Cette alternance est jugée nécessaire pour prévenir l'apparition éventuelle de résistance acquise des bactéries aux désinfectants (Rouillon et *al.*, 2006).

I-5- Environnement hospitalier et infections nosocomiales

De nombreux travaux ont rapporté le rôle important que joue l'environnement hospitalier dans le développement des infections nosocomiales. L'environnement hospitalier est le réservoir le plus important de microorganismes résistants (Mota et Edberg, 2002). La contamination de l'environnement par des microorganismes fait poser la question de leur responsabilité dans la genèse des infections nosocomiales. La présence de plus de 5 UFC/cm² sur une surface qui pourrait rentrer en contact avec les mains, indique qu'il pourrait y avoir un risque accru d'infection pour le patient (Dancer, 2004). Lors d'infections nosocomiales survenant sur un mode épidémique, le microorganisme responsable de l'épidémie peut être retrouvé dans l'environnement. Si ce dernier peut être une source de transmission à l'homme, la preuve formelle de sa responsabilité exclusive dans la genèse de l'infection reste difficile à apporter (Cavallo et *al.*, 2002).

Barbut et Neyme (2006) ont rapporté que Weber et Rutala (1997) ont proposé 7 niveaux de preuve pour évaluer l'implication d'un réservoir environnemental dans la survenue d'une infection :

- a- Survie du microorganisme après inoculation sur l'objet inanimé
- b- Culture du microorganisme à partir de l'objet inanimé
- c- Prolifération du microorganisme sur l'objet inanimé
- d- Acquisition de l'infection non expliquée par d'autres voies reconnues de transmission
- e- Association entre l'exposition à l'objet contaminé et l'infection démontrée par des études de cas témoins
- f- Exposition à l'objet contaminé démontrée par des études prospectives comme la seule cause de relation entre l'exposition et l'infection

- g- Réduction ou élimination de l'infection transmise obtenue après l'élimination ou la décontamination de l'objet (réservoir environnemental).

Dans les années 1950, une importante contamination des surfaces de l'environnement par *S. aureus* a été rapportée dans les chambres des patients atteints d'infections à staphylocoques. A cette époque, des enquêtes ont montré que les adultes sains exposés à un environnement hospitalier avaient quatre fois plus de chance de développer des infections nosocomiales à *S. aureus* que ceux non exposés. Les indices de contamination de l'environnement sont plus élevés lorsque les patients présentent des blessures ou des urines contaminées par *S. aureus* résistants à la méthicilline. Ils contaminent souvent des objets dans leur chambre y compris le linge du lit, les tables de lits, robes de patients et des brassards de tension (Mota et Edberg, 2002).

Le rôle de l'air dans la survenue des infections du site opératoire a essentiellement été étudié dans les interventions de chirurgie orthopédique prothétique. Le niveau de contamination de la plaie opératoire était lié au niveau de contamination de l'air du bloc opératoire. La mise en place dans les blocs de la filtration de haut niveau de l'air a permis de diminuer de plus de deux fois le taux d'infections postopératoires (de 3,4% à 1,6 %), mais à un niveau moindre que l'utilisation d'une antibioprophylaxie (de 3,4% à 0,8%) ou que l'association d'une filtration et d'une antibioprophylaxie (de 3,4% à 0,7%). Ces résultats suggèrent indirectement la responsabilité, au moins partielle d'une transmission aérienne à partir de particules mises en suspension, véhiculées par les turbulences d'air et déposées directement ou indirectement dans la plaie lors de l'intervention chirurgicale (Cavallo et al., 2002).

Le rôle de l'environnement hospitalier est retrouvé lors des infections nosocomiales survenant sur un mode épidémique, comme par exemple des épidémies nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* dans un service d'oncologie pédiatrique par l'intermédiaire de jouets utilisés dans le bain ou en relation avec la contamination de réseaux de distribution d'eau par *Legionella* sp. (Bertrou et al., 2000).

Martinez et Ruthazer (2003) cités par Carling et al. (2008) ont constaté que, les patients qui ont été soignés dans des chambres contaminées sont plus exposés à un risque d'être colonisés par une souche d'ERV ayant un profil PFGE identique à celui du microorganisme contaminant. De même, une autre étude réalisée par Huang et ces

collaborateurs (2006) cités par Carling et *al.* (2008) a permis de constater que les patients qui occupaient une chambre qui avait été précédemment occupé par un patient qui a été infecté et/ou colonisé par les SARM ou ERV ont un risque significativement accru de contracter le même microorganisme (Carling et *al.*, 2008).

Des éclosions d'infections dues à *Acinetobacter baumannii* sont souvent associées à la propagation d'une souche unique liée à plusieurs objets contaminés, principalement les équipements respiratoires ainsi que les mains du personnel hospitalier (Zeana et *al.*, 2003).

Les interactions entre les différents éléments de la chaîne épidémiologique sont donc particulièrement complexes, car l'hôte et l'environnement sont à la fois émetteurs et récepteurs et leurs composants, réservoirs et voies de transmission (Emori et Gaynes, 1993). De plus, des facteurs liés à l'hôte (âge, immunodépression, procédure invasive, site de l'infection, ...) et à l'agent infectieux (virulence, taille de l'inoculum, ...) jouent un rôle important dans la survenue d'une éventuelle infection (Bertrou et *al.*, 2000).

Chapitre II : Résistance aux antibiotiques dans l'environnement hospitalier

II-1- Généralités.....	17
II-2- Résistance des souches environnementales	18
II-3- Propagation de la résistance	21
II-4- Etude de cas de souches BLSE isolées de l'environnement hospitalier rapportées par certains auteurs	22

II-Résistance aux antibiotiques dans l'environnement hospitalier

II-1- Généralités

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique d'organismes qui pourraient avoir une signification clinique. Les microorganismes qui y vivent ont tendance à être plus résistants aux antibiotiques et l'utilisation massive des antibiotiques dans un service donné est associée à une résistance accrue de ces microorganismes environnementaux à ces mêmes antibiotiques. La seule différence significative qui existe entre les bactéries isolées à partir de différents services de l'environnement hospitalier est la résistance aux antibiotiques. Cette différence est associée à la pression exercée par la quantité d'antibiotique consommée dans chaque service. Il existe donc une relation entre la consommation des antibiotiques par les patients et la résistance des microorganismes à ces antibiotiques. De même, l'utilisation des antibiotiques est également associée aux profils de résistance dans un environnement défini (Dancer et *al.*, 2006).

Le dépistage des patients, du personnel et l'échantillonnage de l'environnement montrent que les isolats résistants ne représentent qu'une faible proportion de la flore résistante de l'écosystème hospitalier, une observation communément appelée "effet iceberg". Cette population sous-jacente de microorganismes résistants commensaux et environnementaux est un réservoir important pour l'infection et la propagation de la résistance. Le rôle des transporteurs (personnel, visiteurs ou patients) colonisés par des microorganismes est bien démontré par les foyers hospitaliers de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus pyogenes* (Hosein et *al.*, 2002). L'émergence et la propagation des bactéries résistantes aux antimicrobiens tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, l'entérocoque résistant à la vancomycine et les bacilles à Gram négatif multirésistants continue d'augmenter rapidement. Ces bactéries résistantes aux antimicrobiens sont transmises chez les patients au niveau des hôpitaux par la contamination de leur environnement ou par des vecteurs humains. Ces bactéries servent aussi de réservoir de résistance plasmidique aux antibiotiques qui sont transmis horizontalement entre les souches et les espèces bactériennes (Webb et *al.*, 2005).

II-2- Résistance des souches environnementales

L'adaptation des bactéries à leur environnement implique en partie l'utilisation de l'information génétique portée par des éléments extra-chromosomiques tels que les plasmides, dont certains sont capables de se recombiner avec le chromosome de la cellule hôte. Les plasmides sont transférés verticalement aux cellules filles lors de la multiplication cellulaire et peuvent être transférés horizontalement d'une cellule donatrice à une autre cellule réceptrice par conjugaison. Un exemple typique est les β -lactamases à spectre élargi des bacilles à Gram négatif qui sont à médiation plasmidique (Webb et *al.*, 2005).

Les souches environnementales présentant un profil semblable aux isolats cliniques (des patients et du personnel) provenant des sites les plus exposés au contact avec les mains à savoir, les cadres de lit, poignées de portes et les claviers d'ordinateur, suggérant une transmission dynamique entre ces sites, les mains du personnel et des patients (Dancer et *al.*, 2006). Les bactéries possèdent un nombre remarquable de mécanismes génétiques de résistance aux antimicrobiens. Ils peuvent subir des mutations chromosomiques, exprimer une résistance latente de gènes chromosomiques ou acquérir un nouvel matériel génétique de résistance à travers l'échange direct de l'ADN. Les informations codées par le matériel génétique d'une bactérie permet de développer une résistance à travers trois mécanismes principaux ; la production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique, l'altération de la cible des antibiotiques ou la prévention de l'accès des antibiotiques au site cible (tableau N° III) (Shlaes et *al.*, 1997).

Tableau N° III : Exemples de mécanismes de résistance aux antibiotiques

(Shlaes et al., 1997)

Antibiotiques	Familles	Mécanismes	Bases génétiques	Exemples
β-lactamines	Pénicillines Céphalosporines Monobactames Carbapenemes	Altération des PLP	Chromosomique	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Imperméabilité	Chromosomique	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
		Inactivation par les β-lactamases	Chromosomique et plasmidique	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococci</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine Ofloxacine Norfloxacine Lomefloxacine	Altération de l'ADN gyrase	Chromosomique	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
		Efflux ou réduction de la perméabilité	Chromosomique	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Aminoglycosides	Amikacine Gentamicine Terramycine	Inactivation enzymatique	Plasmidique	<i>Staphylococci</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Streptococci</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> .
		Réduction de la perméabilité	Chromosomique	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> .
		Altération du site de liaison ribosomique	Chromosomique	<i>Streptococci</i>
Macrolides et lincosamides	Erythromycine Clindamycine	Méthylation de la cible de l'ARNr	Chromosomique ou plasmidique	<i>Streptococci</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterococci</i> <i>Staphylococci</i> .
		Efflux	Plasmidique	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i>
Tétracyclines	Tétracycline Minocycline Doxycycline	Efflux	Plasmidique	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> .
		Altération de la cible ribosomale	Plasmidique	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i>
Glycopeptides	Vancomycine Teicoplanine	Altération de la cible	Chromosomique ou plasmidique	<i>Enterococci</i> , <i>Lactobacilli</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Inhibiteurs du Folate	Triméthoprim-sulfaméthoxazole		Chromosomique ou plasmidique	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Neisseria</i>
Rifampine	/	Altération l'ADN polymérase	Chromosomique	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i> , <i>Enterococci</i> <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Pseudomonads</i> .
Chloramphénicol	/	Inactivation de l'Acétyltransférase	Chromosomique ou plasmidique	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i> , <i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Neisseria</i> .
		Efflux	Chromosomique ou plasmidique	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i>
Mupirocine	/	Altération de la cible	Plasmidique	<i>Staphylococci</i>

Le taux de contamination de l'environnement varie en fonction de l'emplacement de la source d'infection chez les patients. La contamination est plus fréquente dans les chambres des patients avec des urines ou des plaies infectées que dans les chambres des patients atteints de bactériémies seulement (Hota, 2004). Les bactéries pathogènes à Gram négatif retrouvées en milieu hospitalier appartiennent à différents groupes bactériens (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*). Elles sont présentes dans l'environnement hospitalier, au niveau des individus (patients, personnel soignant) ou de l'environnement inanimé (surfaces, instruments, solutés) où ils sont sélectionnés du fait de leur capacité à résister facilement aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif en milieu hospitalier recouvre un ensemble hétérogène aussi bien dans ses mécanismes de résistance, ces supports génétiques, sa sélection que son potentiel de dissémination (Liassine, 2000).

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont des pathogènes nosocomiaux majeures résistant aux antibiotiques. Ces microorganismes apparaissent avec une fréquence variable, en particulier dans l'environnement hospitalier. La résistance de *K. pneumoniae* aux céphalosporines à spectre élargi due à des plasmides codant des β -lactamases à spectre étendu est un exemple bien documenté et a augmenté depuis 1980. En outre, les effets de l'expression des porines contribuent à augmenter les niveaux de résistance assurés par ce mécanisme (Hernandez-Alles et al., 1999).

Durant la dernière décennie, *Acinetobacter baumannii* a développé une résistance accrue aux antibiotiques et il est à l'origine de plusieurs épidémies nosocomiales. Le microorganisme a été isolé partout dans l'environnement inanimé, sur les lits de patients colonisés, sur les surfaces à proximité des patients (sur des matelas et des équipements de chevet), dans les chambres (sur les planchers, les éviers, les comptoirs et les poignées de porte) et dans la chambre des humidificateurs où une propagation d'*A. baumannii* par des gouttelettes a été suggérée (Hota, 2004).

Plusieurs travaux ont rapporté une propagation de bactéries à Gram positif telles que *Clostridium difficile*, entérocoques et *Saaphylococcus aureus* résistants aux antibiotiques sur les surfaces inanimées de l'environnement hospitalier (Rampling et al., 2001 ; French et al., 2004 ; Dakic et al., 2005).

II-3- Propagation de la résistance

Malgré l'absence de preuves, l'environnement hospitalier peut agir comme un réservoir potentiel important de pathogènes. Ce réservoir peut ensuite être prolongé par des vecteurs comme la turbulence de l'air, l'humidité sous forme d'aérosol, les mains non lavées ou par contact direct avec un objet inanimé, l'équipement ou le matériel. Les mains du personnel représentent le dernier mode de transmission, mais une hygiène des mains exemplaire ne peut briser la chaîne d'infection lorsque l'environnement est fortement contaminé (Dancer, 2004). Lorsqu'un patient interrompe son traitement antibiotiques, quelques bactéries demeurent, elles sont donc plus susceptibles de développer une résistance et de se propager (Rampling et al., 2001). La dissémination des résistances résulte soit de la dissémination d'une souche résistante dans l'environnement soit de la dissémination de gènes de résistance au sein d'espèces bactériennes différentes (Liassine, 2000).

L'utilisation de l'épidémiologie moléculaire a contribué à améliorer la compréhension du rôle de l'environnement dans les infections nosocomiales en confirmant que les isolats de l'environnement sont soit les mêmes que ceux provenant des patients (cas de *C. difficile*, les espèces de *Candida* ou *Enterococcus* sp.) ou différents (cas de *Acinetobacter*) (Hota, 2004).

La résistance liée à l'acquisition de gènes extérieurs à la bactérie est fréquente. Les gènes sont de localisation chromosomique ou extra-chromosomique, portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons pouvant se répliquer au sein de la bactérie (et donner lieu ainsi à des gènes « multicopies ») ou être transmis à d'autres bactéries, sont responsables du pouvoir de dissémination des résistances aux antibiotiques. Ainsi le gène de résistance de la β -lactamase de type TEM-1 décrit initialement chez une souche d'*E. coli* est aujourd'hui retrouvé non seulement au sein de tous les genres d'entérobactéries, mais aussi au sein d'autres familles bactériennes comme les *Haemophilus* (*H. influenzae*) et les *Neisseria* (*N. gonorrhoeae*) (Liassine, 2000).

La dissémination de souches d'entérobactéries productrices de BLSE est un phénomène complexe qui procède via trois mécanismes intriqués. Le premier mécanisme est la dissémination clonale, dans laquelle une souche productrice de BLSE peut se disséminer par contact horizontal de patient à patient. Le second mécanisme est la transmission d'un ou plusieurs plasmides vers une autre souche (de la même espèce ou d'une espèce différente). Le troisième mécanisme est le transfert d'éléments de résistance présents dans des transposons

ou intégrons entre différents plasmides. La transmission peut produire des épidémies locales au niveau d'une unité de soins intensifs, d'un hôpital ou d'un centre de soins. Elle peut s'étendre au niveau interhospitalier par le transfert de patients colonisés ou infectés (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

II-4- Etude de cas de souches BLSE isolées de l'environnement hospitalier rapportés par certains auteurs

Dans une étude présentée par Palucha et *al.* (1999) sur une épidémie clonale causée par *E. coli* productrice d'une BLSE de type SHV qui a évolué à partir d'une souche de *E. coli* mutant lac 173/97 existant déjà, isolée une année avant l'épidémie dans un service de néonatalogie d'un grand hôpital de Varsovie. Il a été montré qu'une forte consommation d'antibiotiques (35,2 kg de céfuroxime, 5,2 kg de ceftriaxone et de 2,9 kg de ceftazidime en 1997) est l'un des facteurs favorisant l'évolution rapide des gènes codant des BLSE qui se sont propagés dans la microflore de cet environnement. Cette épidémie est une conséquence directe d'un défaut du système d'égout qui a causé la contamination du vestiaire utilisé par le personnel du service de néonatalogie une semaine avant le premier isolement. Douze isolats d'*Escherichia coli* producteurs de BLSE de type SHV ont été isolés de 11 patients. Malgré que l'épidémie soit clonale ; les isolats présentent le même type de β -lactamases et le même profil RAPD et RFLP avec le mutant lac de *E. coli* 173/97 isolé une année auparavant (Palucha et *al.*, 1999).

Un exemple similaire de diversification d'une souche épidémique productrice de BLSE lors d'une épidémie conduisant à l'émergence d'une souche surexprimant l'enzyme a déjà été signalé par French et *al.* (1996). Dans leur étude, cependant, aucune différence dans l'ADN plasmidique des isolats de souches de *Klebsiella pneumoniae* produisant des BLSE de bas ou de haut niveau n'a été observée. Les rapports de French et *al.* (1996) et de Palucha et *al.* (1999) montrent un aspect très dangereux de souches productrices de BLSE à savoir, un éclat dans leurs niveaux de résistance. De tels événements peuvent être favorisés par l'utilisation des β -lactamines sur des souches qui, en dépit de la production de BLSE sont identifiées *in vitro* comme étant sensibles à ces antibiotiques.

Gaillot et *al.* (1998) ont signalé une épidémie due à *Klebsiella pneumoniae* résistante au céftazidime constatée au niveau de deux services d'obstétrique et de gynécologie de

l'hôpital de Boucicaut (Paris, France). Cette espèce a été isolée seulement chez deux nouveau-nés qui se sont avérés être infectés ou colonisés par cette espèce et en aucun cas chez les autres patients, ce qui exclut l'implication du personnel et oriente vers une contamination environnementale. Quarante quatre échantillons provenant d'eau de source, éviers, humidificateurs, désinfectants, literies et les meubles n'ont pas révélé la présence de *Klebsiella pneumoniae* résistante au céftazidime. L'analyse rétrospective de l'histoire des malades contaminés durant l'hospitalisation a démontré que la seule caractéristique commune entre ces derniers est le fait qu'ils avaient subi une échographie transvaginale dans la salle d'urgence. Toutefois, la présence de *Klebsiella pneumoniae* résistante à la ceftazidime a été détectée dans un gel d'échographie dans un conteneur situé dans la salle d'urgence. Il est apparu que les bouteilles de gel ont été ouvertes et vidées dans un conteneur à large ouverture jugé plus commode pour le revêtement de la sonde d'échographie. Le cycle de la contamination a été brisé une fois que le conteneur a été enlevé et l'utilisation unique du gel de couplage a été adoptée (Gaillot et al., 1998).

D'agata et al. (1999) ont décrit la complexité et l'hétérogénéité de la contamination environnementale par des bacilles à Gram négatif résistants à la céftazidime. Différentes espèces, chacune avec plusieurs souches uniques ont été isolées sur des surfaces inertes. Les chambres ont été contaminées par plus d'une espèce et des souches différentes ont été isolées sur les mêmes lieux de l'environnement et le même jour. Bien que la contamination de l'environnement ne soit pas considérable, il existe une liaison épidémiologique entre l'environnement, les patients et le personnel (D'agata et al., 1999).

Ces auteurs ont rapporté une contamination non épidémique de l'environnement, de deux unités de soins intensifs de chirurgie d'un hôpital en Israël, de l'ordre de 5% par des bacilles Gram négatifs résistants à la céftazidime. Les espèces incriminées sont *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., *Klebsiella oxytoca* et *Stenotrophomonas* spp. La souche S-2 de *Stenotrophomonas* sp. a été isolée à partir d'un patient après 15 jours de son admission et elle a été également isolée de l'évier de la chambre du patient, 26 jours avant son isolement chez le même patient. *P. aeruginosa* et *E. cloacae* ont été retrouvées sur des surfaces de l'environnement même après 5 et 13 jours respectivement, après que les patients colonisés par des souches identiques soient sorties. Trois souches ont été isolées à partir des surfaces inertes sur des périodes prolongées ; *Acinetobacter lwoffii* AW-1 pendant 98 jours, *E. cloacae* EC-1 pendant 89 jours et la souche S-2 de *Stenotrophomonas* sp. pendant 30 jours (D'agata et al., 1999).

Kac et ces collaborateurs (2004) ont rapporté lors d'une épidémie due à des entérobactéries productrices de BLSE que l'environnement d'une unité de soins intensifs de chirurgie cardiaque du CHU de Paris (France) est contaminé par quatre espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases à spectre large (*Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *C. diversus*), le taux de cette contamination est de 26%. Cette étude confirme que les éviers et les comptoirs et surtout les articulations des comptoirs représentent des sources généralement méconnues d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE. La capacité des bactéries à Gram négatif à survivre dans des environnements humides pendant de longues périodes permet d'expliquer leur présence dans ces sites. Cela souligne la nécessité de conserver toutes les surfaces inanimées entourant les patients aussi sèches que possible, en particulier dans les unités de soins intensifs où la possibilité de transmission croisée par les agents pathogènes nosocomiaux via les mains du personnel est particulièrement élevée. Dans une étude réalisée par ces mêmes auteurs, sur 2038 patients admis aux soins intensifs, 1,7% des patients étaient colonisés ou infectés par au moins l'une des espèces de BLSE citées ci-dessus.

L'analyse comparative par PFGE a révélé que les surfaces inanimées peuvent être contaminées par plusieurs espèces ou souches d'entérobactéries BLSE. Une souche peut survivre pendant des semaines ou des mois dans des sites multiples et certaines souches cliniques peuvent être récupérées à partir d'échantillons de l'environnement, ce qui soulève la possibilité d'une origine exogène de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram négatives. Les entérobactéries BLSE sont supposées être transmises comme d'autres agents pathogènes nosocomiaux de la flore cutanée transitoire après un contact direct avec un patient colonisé en l'absence d'hygiène des mains par le personnel de soin (Kac et al., 2004).

Randrianirina et al. (2009) ont rapporté des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la ceftazidime isolées chez dix nouveau-nés hospitalisés dans deux hôpitaux d'Antananarivo (Madagascar). La propagation entre ces deux hôpitaux où aucun nouveau-né n'a été transféré était probablement due au fait que le personnel des deux hôpitaux travaillent aussi ensemble dans des cliniques de consultation externe. L'analyse de l'environnement des services de maternité a révélé la présence de *K. pneumoniae* dans un tube nasogastrique, dans l'eau du robinet utilisée pour rincer la sonde nasogastrique, le tube d'aspiration et aussi sur la surface d'une table de soins. Un membre du personnel travaillant dans l'unité pédiatrique de l'hôpital de Soavinandriana a été trouvé porteur d'une souche de *Klebsiella* résistante à la céftazidime. La source environnementale principale, en particulier pour un hôpital, est le

liquide utilisé pour rincer les tubes d'aspiration dans les services pédiatriques. Le risque de contamination à partir des tubes d'aspiration est très élevé, cela explique le fait qu'une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée d'un tube nasogastrique à l'hôpital Befelatanana a également été isolée à partir de 9 patients hospitalisés à l'hôpital Soavinandriana. Les analyses phénotypiques et génotypiques de tous les isolats cliniques ont indiqué que neuf cas étaient dus à un clone unique qui abrite deux types de BLSE (SHV-2 et CTX-M-15). Toutes les souches isolées des nouveau-nés, de l'eau du robinet pour le rinçage des tubes et de la table de soins avaient le même profil de résistance : elles sont résistantes aux quinolones de première et de deuxième génération, nitroxoline, céfotaxime, ceftazidime et aztréonam et sensibles, ou présentent une résistance intermédiaire à la céfoxitine. Tous les isolats étaient résistants à la gentamicine et à la nétilmicine et sensibles à l'amikacine. Les isolats étaient également résistants au triméthoprime-sulfaméthoxazole mais sensibles à l'imipénème. Les souches isolées à partir du tube nasogastrique et du prélèvement rectal montrent un phénotype de résistance différent avec des zones d'inhibition plus larges autour des céphalosporines de troisième génération et une sensibilité totale à la première et deuxième génération de quinolones (Randrianirina et al., 2009).

Dans une étude réalisée en Algérie par Touati et ses collaborateurs (2007a) sur la contamination de l'environnement hospitalier par des entérobactéries productrices de β -lactamases au niveau de deux hôpitaux, une contamination de 9% représentée par 14 espèces d'entérobactéries résistantes au céftazidime et céfotaxime dont neuf sont des *E. cloacae* et cinq sont des *Klebsiella pneumoniae* isolées de différentes surfaces inanimées des services bloc opératoire (Six isolats), chirurgie (quatre isolats), d'une unité de soins intensifs (trois isolats) et médecine (un isolat) a été observée. Les 14 espèces d'entérobactéries sont productrices d'une BLSE de type CTX-M-15 et sont résistantes à la ticarcilline, pipéracilline, cefpirome, céfotaxime, céftazidime et presque la totalité sont résistantes à la gentamicine, tobramycine et triméthoprime-sulfaméthoxazole. Les isolats étaient intermédiaires ou résistants à la céfépime et l'aztréonam et aucun des isolats n'étaient résistants à l'imipénème. L'isolat d'*E. cloacae* S13 était résistant aux fluoroquinolones. La présence d'isolats producteurs de CTX-M-15 dans l'environnement hospitalier peut agir comme un réservoir de gènes de résistance qui peut être transmis horizontalement à d'autres souches (cliniques ou environnementales). L'analyse génétique par RAPD (random amplification polymorphic DNA) de cinq souches cliniques et environnementales de *K. pneumoniae* CTX-M-15 a

montré que trois isolats environnementaux de *K. pneumoniae* montrent un profil identique et unique suggérant la parenté clonale.

Dans une enquête multicentrique menée par Abid et *al.*, (2007) au niveau des différents services des hôpitaux de la wilaya de Annaba, 20 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées à partir des prélèvements de l'environnement hospitalier dont 8 sont des BLSE et 80 souches ont été isolées à partir de prélèvement pathologiques. Elles ont été isolées à partir de drap du patient (02), de l'alcool iodé (01), d'une paillasse (01), des mains d'infirmière (01), d'un savon (02) et à partir de ciseaux (01). En comparant les phénotypes de BLSE dans le cas des souches productrices de BLSE et des antibiogrammes trouvés chez l'ensemble des souches isolées, ces auteurs ont pu mettre en évidence la présence de 20 souches aussi bien chez les malades hospitalisés que dans leur environnement. Ceci conduit à conclure que les souches de *K. pneumoniae* peuvent être transmises d'un réservoir humain à un réservoir environnemental ou le cas contraire via des procédures invasives (soins, interventions chirurgicales ou autres) (Abid et *al.*, 2007).

Chapitre III : Métaux lourds

III-1- Généralités sur les métaux lourds	27
III-2- Intérêts et utilisation des métaux lourds	28
III-2-1- Mercure	28
III-2-2- Cuivre	29
III-2-3- Zinc	29
III-2-4- Cadmium	30
III-2-5- Plomb	30
III-3- Résistance aux métaux lourds	31
III-3-1- Résistance par séquestration	32
III-3-2- Résistance par imperméabilité	34
III-3-3- Système d'efflux	34
III-3-4- Résistance par détoxification enzymatique	36

III- Métaux lourds

III-1- Généralités sur les métaux lourds

Un métal est défini comme un corps simple caractérisé par un éclat particulier dit éclat métallique, une aptitude à la déformation et une bonne capacité à conduire la chaleur et l'électricité. Les métaux sont dits lourds lorsque leur densité est supérieure à 5. Ils sont présents dans tous les compartiments écologiques de la biosphère, cependant leur concentration est généralement inférieure à 1‰ (1g/kg) en matière sèche dans la croûte terrestre et à 0,1‰ (100 mg/kg) dans la matière sèche des organismes (Mirouze, 2005).

Les métaux lourds sont également appelés éléments traces métalliques. Ils appartiennent pour la plupart aux métaux de transition qui sont compris entre le Vanadium (V) et l'Arsenic (As) (à l'exception du Scandium et du Titane), du Zirconium (Zr) à l'Antimoine (Sb) (sauf l'Yttrium (Y)), de Lanthane (La) au Polonium (Po). Les lanthanides et les actinides peuvent être considérés comme des métaux lourds. Sur les 90 éléments, 21 sont des non-métaux, 16 sont des métaux légers et 53 sont des métaux lourds (Nies, 1999).

Les métaux de transition ont deux électrons au niveau de leur orbitale 4s et un nombre d'électrons variable (1 à 10) sur l'orbitale 3d. Cette structure rend bien compte d'un certain nombre de propriétés communes à ces éléments. Ils ont tous la valence 2 et donnent des ions de type M^{2+} (Nies, 1999).

Les métaux sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, à la fois parce qu'ils sont naturellement présents et proviennent de la dégradation des roches ou des émissions volcaniques (sources naturelles) ou parce que certaines activités (minières et industrielles) de l'homme favorisent leur dispersion (source anthropique) (Amir, 2005). On distingue les métaux ayant un rôle biologique, ils sont essentiels et nécessaires à de faibles doses. Ce sont les oligo-éléments comme le Fer, qui est présent dans de nombreux cytochromes. D'autres, par contre, sont non essentiels et éventuellement toxiques (Plomb et Argent). Cependant, même les métaux essentiels peuvent devenir toxiques s'ils sont présents à de fortes concentrations ; on parle alors d'effet antagoniste (Nies, 1999). La raison de cette toxicité peut être liée à différents facteurs :

- L'inhibition des activités enzymatiques : Les cations métalliques sont en mesure de se fixer sur des résidus cystéine ou d'acide aspartique présents dans les sites actifs de plusieurs enzymes. De même, en large excès, un ion métallique peut rentrer en compétition avec un autre ion situé dans le site actif de l'enzyme.
- L'altération de la structure des acides nucléiques : la fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques peut entraîner des variations de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes.
- Les espèces oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires peuvent interagir avec les métaux et former des radicaux libres qui endommagent différents constituants cellulaires tels que les molécules d'ADN (pouvant mener à l'instabilité du génome), les protéines en créant des pontages entre molécules ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire (Monchy, 2007).

III-2- Intérêts et utilisation des métaux lourds

Les métaux lourds jouent un rôle important dans de nombreuses réactions biochimiques en raison de leur capacité à former des composés complexes. Certains métaux, comme (Co, Cu, Fe, Mn, Ni et Zn) sont essentiels, ils servent comme des micronutriments (Ji et Silver, 1995) et comme des cofacteurs indispensables de certaines protéines pour leur stabilisation ou leur conformation, mais deviennent toxiques à haute concentration. Par exemple, le nickel est un cofacteur des uréases et des hydrogénases et le cobalt est un cofacteur chez certaines enzymes du métabolisme de la méthionine ou de la vitamine B12 (Monchy, 2007). D'autres (Ag, Al, Cd, Au, Pb et Hg) n'ont pas de rôles biologiques et ils sont potentiellement toxiques pour les organismes vivants et en particulier pour les microorganismes (Bruins et *al.*, 2000 ; Abskharon et *al.*, 2008).

III-2-1- Mercure

A la fin des années 1880, le diéthylmercure a d'abord été utilisé dans le traitement de la syphilis, une pratique qui a ensuite été arrêtée en raison de ses propriétés toxiques. Toutefois, au début du 20^{ème} siècle, la découverte des propriétés fongicides des composés alkyl à chaîne courte a conduit à des applications commerciales dans l'agriculture. Le thimérosal, une forme de l'éthylmercure, communément connu sous différents noms comme le méthiolate ou le mercurochrome, ont été couramment utilisés comme antiseptiques. Il est également utilisé comme conservateur efficace de vaccins (un vaccin contient en général entre 0,5 à 25µg de mercure, cas du thimérosal) (Tchounwou et *al.*, 2003).

Le phénylmercure est utilisé aux Etats Unis comme pesticide pour prévenir la croissance des moisissures sur les murs et comme conservateurs dans les peintures au latex pour prévenir la décoloration et la croissance de microorganismes (Tchounwou et *al.*, 2003). Le mercure est également utilisé dans les amalgames dentaires en association avec l'argent, l'étain et le cuivre (Afssaps, 2005).

III-2-2- Cuivre

Sous sa forme métallique ou ionique, le cuivre, a été exploité de façon empirique depuis l'antiquité pour des applications médicales. Plus tard, les propriétés thérapeutiques de ce métal ont été exploitées pour le traitement des maladies de la peau et des plaies. Ces derniers temps, le cuivre a été introduit dans les vêtements, la literie et autres articles, en leur offrant des propriétés biocides (Santo et *al.*, 2008).

Des études menées sur la survie de différentes espèces bactériennes, telles que *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* et *Klebsiella pneumoniae* sur des surfaces en cuivre ont permis de constater qu'une exposition au cuivre tue rapidement les bactéries (Santo et *al.*, 2008). L'utilisation des alliages de cuivre dans l'environnement hospitalier peut offrir la possibilité de réduire la propagation des infections à *Clostridium difficile* (Weaver et *al.*, 2008).

Le cuivre est utilisé dans la métallurgie, dans la fabrication des alliages de bronze (avec l'étain), de laiton (avec le zinc) ou de joaillerie (avec l'or et l'argent). Il est très largement employé dans la fabrication de matériel électrique (fils, enroulements de moteurs, transformateurs, ...), dans la plomberie et dans les équipements industriels. Sous forme d'acétate de cuivre, il est utilisé comme pigments pour les céramiques et les teintures, comme fongicide et comme insecticide (Casas, 2005).

III-2-3- Zinc

Le zinc est indispensable au métabolisme des êtres vivants (oligoéléments), en particulier comme coenzyme. Il est principalement utilisé pour les revêtements de protection des métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation, traitement par immersion, ...). Il entre dans la composition de divers alliages (laiton, bronze et alliages légers). Il est utilisé dans la construction immobilière, les équipements pour l'automobile et les chemins de fer. Il

constitue un intermédiaire dans la fabrication d'autres composés et sert d'agent réducteur en chimie organique et de réactif en chimie analytique (Casas, 2005).

Les effets bénéfiques de l'apport complémentaire de zinc ont été montrés dans le traitement de cas de diarrhées, de pneumonie et de malaria (Mirouze, 2005). Wheeldon et *al.* (2008) ont rapporté l'efficacité antimicrobienne des surfaces métalliques dont l'acier inoxydable et la zéolite (argent / zinc).

III-2-4- Cadmium

Le cadmium a une grande résistance à la corrosion, son point de fusion est bas, il a une bonne conductivité de l'électricité, ses produits dérivés ont une bonne résistance aux fortes températures. Il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium, en particulier le rayon ionique, facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes. Les usages du cadmium se situent principalement en électricité (accumulateurs), en électronique, en métallurgie (traitement des surfaces par cadmiage) et dans l'industrie des matières plastiques (stabilisateur de polymères) (Casas, 2005).

En raison du rôle des différents oligoéléments comme le fer, le cadmium et le chrome sur l'activité antibactérienne des divers antibiotiques, des études suggèrent une association entre métal et antibiotique en vue d'obtention de nouvelles molécules antimicrobiennes (Kalantari, 2008).

III-2-5- Plomb

L'utilisation du plomb est directement liée à la métallurgie avec deux pics notables : sous l'empire romain pour la production de la monnaie, les canalisations et la vaisselle et pendant la révolution industrielle dans la fabrication des accumulateurs, les gaines de câbles électriques, les tuyaux pour les canalisations d'eau et de gaz, les bandes et les tables de plomb laminées pour les couvertures et l'insonorisation dans les bâtiments, le plomb de chasse, les capsules de bouteilles et les métaux d'apport pour soudures. Les plaques de plomb sont utilisées dans la lutte contre la corrosion (industrie chimique) et dans la protection contre les rayonnements. Le plomb rentre dans la composition de nombreux alliages (Benedetto, 1997 ; Casas, 2005) et comme insecticides sous forme d'arséniate de plomb (Trajanovska et *al.*, 1997).

III-3- Résistance aux métaux lourds

L'interaction des bactéries avec les métaux se produit sur une gamme de concentrations en métaux allant du nanomolaire pour l'homoeostasie (métaux essentiels) au millimolaire pour la résistance (toxicité pour ces mêmes métaux) et jusqu'au molaire pour certains chimiolithotrophes acidophiles (figure 02) (Monchy, 2007).

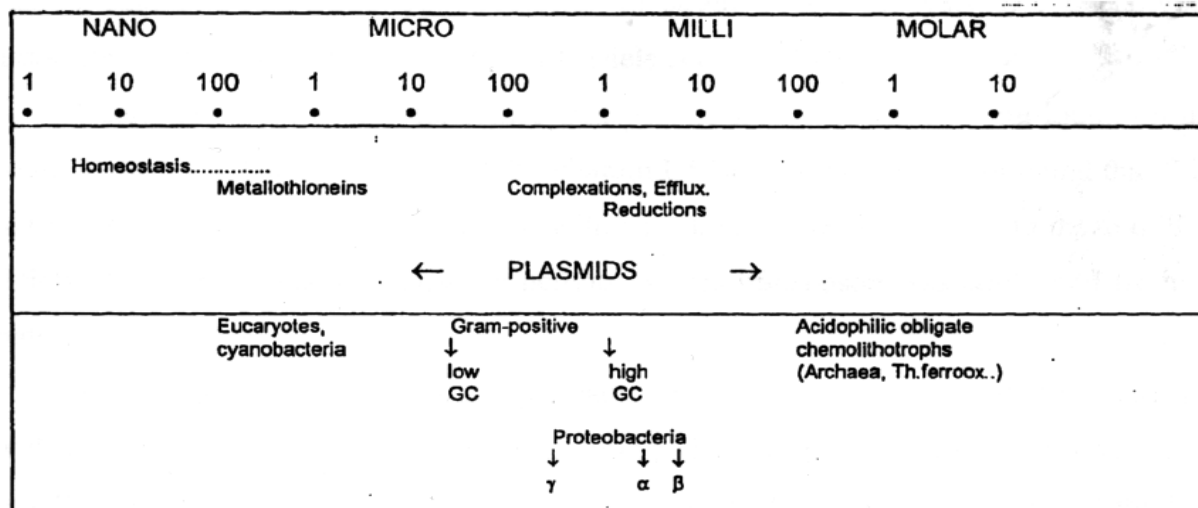


Figure 02 : Gamme de concentrations en métaux lourds et réponses biologiques associées (Monchy, 2007)

La nature des interactions dépend du rôle biologique du métal dans la cellule. La grande variété de métaux lourds et de leurs effets biologiques nécessite chez la bactérie une régulation fine pour le maintien (homoeostasie) et le contrôle de leur concentration intracellulaire (Nies, 1999). Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques (dans le domaine nanomolaire) ou l'entrée de métaux en quantité toxique (de l'ordre du micromolaire) (Monchy, 2007).

La résistance microbienne aux métaux est hétérogène que ce soit sur le plan génétique ou biochimique. Elle peut être codée par le chromosome, le plasmide ou le transposon avec l'implication d'un ou de plusieurs gènes. Au niveau biochimique, les microorganismes montrent une diversité dans les types de mécanismes de résistance qui ont évolué pour comprendre six différents types fondamentaux. Ces différents mécanismes se produisent seuls ou en diverses combinaisons pour acquérir une résistance (Rouch et *al.*, 1995).

Les plasmides ou les transposons portant des déterminants de la résistance aux métaux contribuent à la transmission horizontale ainsi que verticale, donc ils sont capables de se propager dans les populations bactériennes à des taux plus élevés que les mutations chromosomiques conférant la résistance et qui sont principalement limitées à la transmission

verticale. Les résistances multiples peuvent s'accumuler sur des plasmides qui permettent à la résistance à un certain nombre de métaux de se propager simultanément à travers une population. La mobilité de la résistance dans les populations est amplifiée si elle est déterminée par des transposons qui sont contenus sur des plasmides (Rouch et *al.*, 1995).

Les ions métalliques entrent dans la cellule par deux voies. La première, empruntée par une large gamme de substrats, est rapide, indépendante du métal, fait intervenir des porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers de la membrane bactérienne. La seconde, requiert une consommation d'énergie souvent sous la forme d'ATP (cas du transporteur ABC). Ces systèmes sont inductibles en réponse à des besoins particuliers (Monchy, 2007).

III-3-1- Résistance par séquestration

La séquestration du métal dans un compartiment de la cellule ou sur la surface externe de la membrane est un mécanisme efficace mis en place par les bactéries pour résister aux métaux lourds. Cette séquestration peut agir comme première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leurs effets toxiques comme elle peut agir en complément d'autres mécanismes de résistance tel que l'efflux, évitant la réentrée du métal expulsé, en particulier dans les situations extrêmes (Monchy, 2007).

III-3-1-1- Séquestration intracellulaire

Elle consiste en l'accumulation de métaux dans le cytoplasme pour éviter une exposition aux composants cellulaires essentiels. Les métaux les plus fréquemment séquestrés sont le Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Deux exemples existent pour cette forme de résistance aux métaux: la production de métallothionéine chez *Synechococcus* sp. et des protéines riches en cystéine chez *Pseudomonas* sp. (Silver et Phung, 1996).

Le système de résistance aux métaux chez *Synechococcus* sp. est composé de deux gènes ; *smtA* et *smtB*. Le gène *smtA* code pour une métallothionéine qui se lie au Cd^{2+} et au Zn^{2+} . Ce gène est induit par des concentrations élevées en Cd^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} et il est réprimé par le produit du gène *smtB*. *Pseudomonas putida* isolé à partir des eaux usées produit trois protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine, qui peuvent se lier à la métallothionéines (Bruins et *al.*, 2000).

III-3-1-2- Séquestration extracellulaire

La résistance aux métaux basée sur la séquestration extracellulaire existe aussi bien chez les bactéries que chez les levures et les champignons (Bruins et *al.*, 2000). Ce type de séquestration peut provoquer une résistance à condition que des niveaux suffisants de la substance séquestrante soient produits (Rouch et *al.*, 1995).

Saccharomyces cerevisiae réduit l'absorption du Ni^{2+} par excrétion d'une grande quantité de glutathion qui se lie avec une grande affinité aux métaux lourds (Murata et *al.*, 1985). *Citrobacter* sp. forme des complexes insolubles de phosphate de cadmium pour acquérir une résistance alors que *Enterobacter aerogenes* montre une capacité à éliminer les ions de Cd^{2+} du milieu environnant en excréant du soufre qui limite le flux métallique vers l'intérieur par précipitation (Bruins et *al.*, 2000).

La séquestration peut aussi se faire sous forme de cristaux (biominéralisation) liés à une alcalinisation du milieu résultant de l'activité cellulaire et à la formation de carbonates à la surface cellulaire qui, lorsqu'il y a sursaturation, cristallisent avec les ions métalliques présents (Monchy, 2007).

La résistance à des niveaux élevés en zinc peut être due à la séquestration extracellulaire ou intracellulaire, le piégeage par des métallothionéines ou le système d'efflux (Figure 03) (Brown et *al.*, 1991).

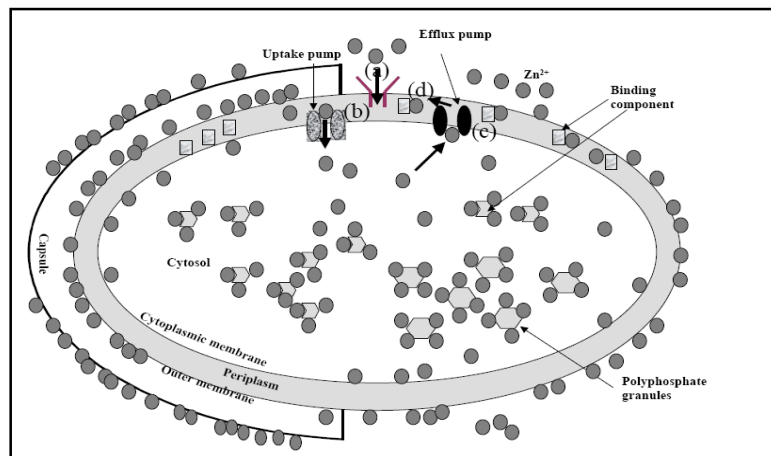


Figure 03 : Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries (Brown et *al.*, 1991).

- (a) exclusion du métal par une barrière de perméabilité ;
- (b) exclusion par le système d'efflux ;
- (c) séquestration intracellulaire ;
- (d) séquestration extracellulaire.

III-3-2- Résistance par imperméabilité

Les modifications de la structure de la paroi cellulaire, de la membrane ou de l'enveloppe des microorganismes sont des exemples de résistance aux métaux par imperméabilité. Un exemple bien connu est l'exclusion du Cu^{2+} résultant d'une modification des porines membranaires par *E. coli* B (Rouch et al., 1995), causée par une seule mutation sur un seul gène, ce qui diminue la perméabilité membranaire aux ions métalliques (Ji et Silver, 1995 ; Rouch et al., 1995).

Un autre exemple est la liaison non spécifique des métaux à la membrane externe ou à l'enveloppe (cas de la liaison entre le cuivre, le cadmium ou le zinc avec l'acide polygalacturonique), cela offre une protection limitée contre les métaux en raison de la saturation des sites de liaison (Bruins et al., 2000) et contribue ainsi à la tolérance naturelle des microorganismes aux métaux (Rouch et al., 1995).

Les groupements carboxyles du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif et les groupements phosphates chez les bactéries à Gram négatif sont les principaux sites de liaison des ions cationiques (Gadd, 2009).

Les bactéries, telles que *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida* et *Arthrobacter viscosus*, qui produisent naturellement une couche de polysaccharides extracellulaires montrent une capacité de bioabsorption des ions métalliques et les empêchent d'interagir avec les composants cellulaires vitaux (Bruins et al., 2000). Ces exopolysaccharides forment des complexes avec les cations métalliques entraînant l'immobilisation des métaux dans le polymère. Ces complexes résultent généralement des interactions électrostatiques entre les ligands métalliques et les charges négatives du biopolymère (Pal et Paul, 2008).

La liaison périplasmique du Cu^{2+} est retrouvée chez *Pseudomonas* sp. où la résistance est codée par un opéron de quatre gènes : *copA*, *copB*, *copC* et *copD*. Les gènes *copA* et *copB* confèrent une résistance partielle qui devient complète en présence des gènes *copC* et *copD* (Bruins et al., 2000).

III-3-3- Système d'efflux

Les systèmes actifs de transport ou d'efflux représentent la catégorie la plus importante des mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries (Monchy, 2007). Les microorganismes utilisent des mécanismes de transport actif pour exporter des métaux

toxiques du cytoplasme. Ces mécanismes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. Les métaux non essentiels entrent normalement dans la cellule par des systèmes de transport des éléments nutritifs mais, ils sont rapidement exportés (Bruins et *al.*, 2000).

Les pompes à efflux sont soit à ATPases (cas des ATPases de cadmium et du cuivre chez les Gram positifs et de l'ATPase arsénite plasmidique chez les Gram négatifs) ou chimiosmotiques (cas des systèmes d'efflux de cations divalents chez *Alcaligenes* et le système d'efflux arsénite chromosomique chez les Gram négatifs et plasmidiques chez les Gram positifs). Les mécanismes d'efflux sont souvent les mêmes chez toutes les bactéries (Ji et Silver, 1995).

Chez les bactéries Gram négatives, ce transport actif, qui doit être capable de faire passer les ions à travers les deux membranes est principalement assuré par les transporteurs primaires, directement couplés à l'hydrolyse de l'ATP (transporteur ABC, ATPase) et secondaires où le passage au travers de la membrane se fait grâce à un gradient électrochimique (protéines RND, MFS et CDF) (Monchy, 2007).

Chez *E. coli*, la résistance au cuivre est basée sur un mécanisme d'efflux par lequel le cuivre est expulsé de la cellule. Les protéines d'efflux sont exprimées par des gènes plasmidiques *pco*, qui sont à leur tour dépendants de l'expression des gènes chromosomiques *cut*. Deux gènes *cut* (*cutC* et *cutF*) ont été identifiés, ils codent une protéine de liaison au cuivre et une lipoprotéine au niveau de la membrane externe. L'évolution de la résistance au cuivre est obtenue grâce à la modification des gènes chromosomiques de l'absorption du cuivre (Spain et Alm, 2003). A des concentrations élevées en cuivre les gènes *pco* sont induits et modifient le métabolisme du cuivre. PcoC est une protéine intracellulaire qui lie le cuivre et qui fournit une importante protection contre les concentrations élevées en cuivre et elle peut agir comme une protéine de transport intracellulaire. L'augmentation de l'exclusion du cuivre et de sa modification en une forme biologiquement réfractaire est une fonction de la protéine PcoA et PcoB. La protéine PcoR modifie l'expression des gènes *pco* et peut également modifier l'expression des gènes *cut* modifiant ainsi le flux du cuivre à travers la cellule (Brown et *al.*, 1991) (figure 04).

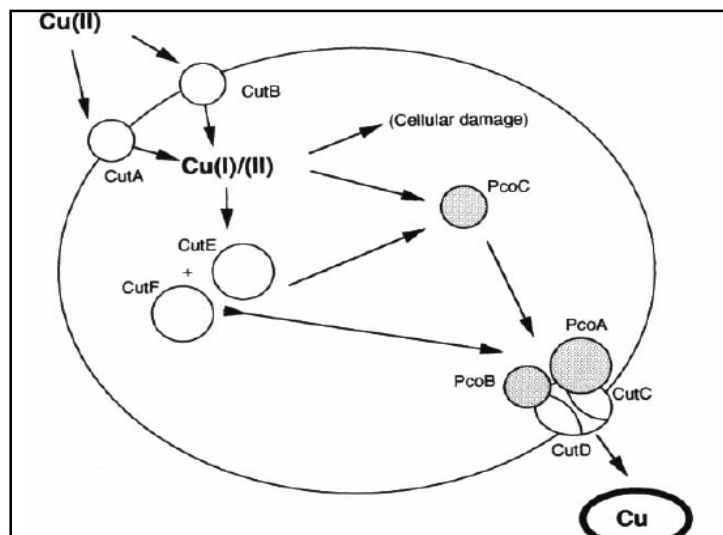


Figure 04 : Mécanismes de résistance au cuivre chez *E. coli* (Brown et al., 1991)

III-3-4- Résistance par détoxification enzymatique

La transformation biologique de certains métaux lourds est un processus important qui peut être réalisé par une grande variété de microorganismes, principalement des bactéries et des champignons. Les métaux ne peuvent être décomposés en d'autres produits, mais à la suite de l'action biologique, subissent des changements de valence et/ou de conversion en composés organométalliques. Les deux processus peuvent être considérés comme des mécanismes de détoxification (Gadd et Griffiths, 1978).

Le principal mécanisme de résistance aux sels de mercure est la détoxification du mercure élémentaire. Il existe deux processus impliqués dans le mécanisme de résistance : le transport des ions de mercure dans la cellule et la réduction enzymatique.

La résistance bactérienne aux Hg^{+2} est déterminée par deux enzymes cytoplasmiques inductibles. Elle consiste en la captation des ions mercure (Hg^{+2}) via la protéine périplasmique MerP et leur transport dans la cellule par la protéine MerT qui forme un canal dans la membrane interne. Ensuite, la réductase MerA, réduit, dans le cytoplasme, l'ion Hg^{2+} en Hg^0 non toxique et qui se volatilise hors de la cellule (Monchy, 2007).

Les souches qui détoxifient le mercure organique présentent une seconde enzyme, l'organomercuriel lyase qui clive la liaison C-Hg et libère le Hg^{2+} qui est à son tour volatilisé par l'action de l'enzyme mercure réductase (Foster, 1983).

Les gènes de résistance sont portés par des opérons *mer* (figure 5) qui sont généralement localisés sur des chromosomes, des plasmides, des transposons et des intégrons. L'opéron *mer* est constitué d'un ensemble de gènes qui codent des protéines fonctionnelles de

régulation (*merR*, *merD*), de transport (*merT*, *merP* et *merC*) et de réduction (*merA* et *merB*) (figure 05). Le mécanisme d'induction des gènes *mer* par le mercure implique une seule protéine, MerR, le produit du gène *merR*, qui agit comme un répresseur de la transcription de l'opéron *mer* en l'absence de mercure et comme inducteur en présence de Hg^{2+} (Brown et al., 1991). La résistance au mercure peut être à spectre étroit ou à spectre large.

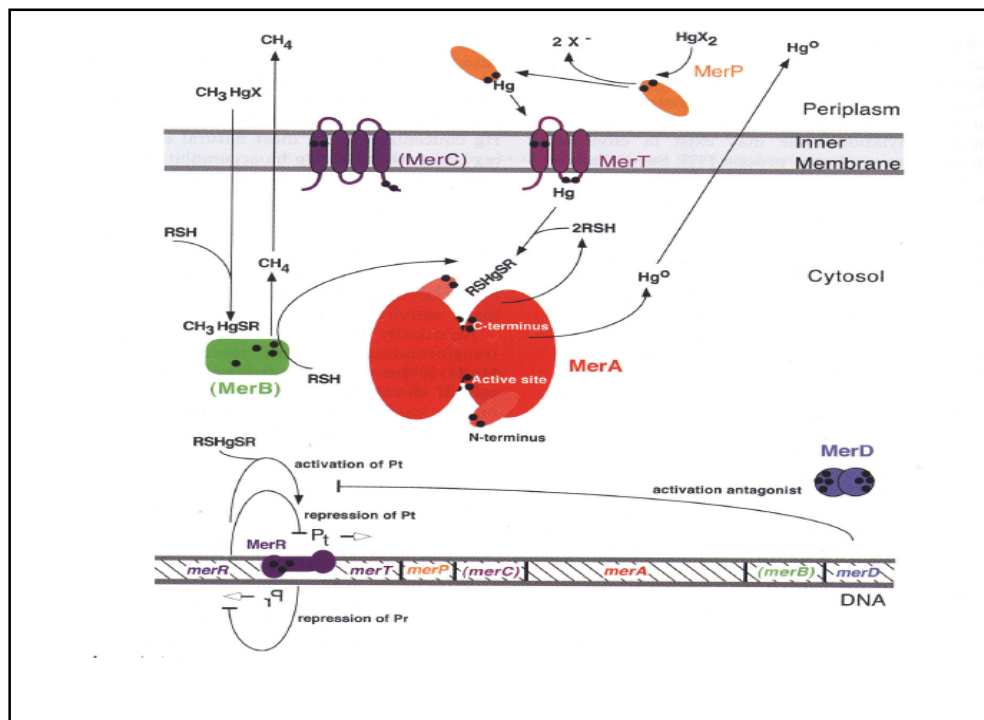


Figure 05 : Mécanismes de résistance au mercure (Barkay et al., 2003)

III-3-4-1- Résistance à spectre étroit

Le spectre étroit est déterminé par les souches exprimant l'enzyme mercure réductase (MerA) seule et concerne le mercure inorganique tel que le chlorure de mercure (Nascimento et Chartone-Souza, 2003). Les bactéries entériques volatilisent le Hg^{2+} et présentent également une résistance au mercurochrome (merbromin) et à l'acétate de mercure sans hydrolyse ou réduction du mercure (Foster, 1983).

III-3-4-2- Résistance à spectre large

Les souches qui présentent les deux enzymes ; mercure réductase (MerA) et organomercuriel lyase (MerB) sont dites à large spectre. Le phénotype à spectre étroit s'étend pour inclure le phénylmercure et le thimérosal. Bien que la forme Hg^0 volatile soit formée à partir du thimérosal, de l'hydroxymercuribenzoate, du méthyle et de l'éthyle mercure, la

résistance est uniquement conférée au thimérosal (Foster, 1983). Le gène *merB* qui code la protéine MerB, est localisé en aval du gène *merA* de l'opéron (figure 5) (Mindlin et al., 2002). Cependant, ce gène est rarement trouvé chez les bactéries à Gram négatif (Nascimento et Chartone-Souza, 2003).

Matériel et Méthodes

I- Sites de prélèvement	39
II- Prélèvement	41
III- Isolement et purification	41
IV- Identification des entérobactéries	42
V- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.....	43
VI- Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	45
VI-1- DD-test.....	45
VI-2- DD-test sur gélose additionnée de cloxacilline	46
VII- PCR du gène <i>bla</i>	46
VIII- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	47
IX- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds	48
IX- 1- Préparation des solutions initiales en sels métalliques	48
IX-2- Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu solide.....	48
X- Transfert de la résistance par conjugaison	50

Matériel & Méthodes

I- Sites de prélèvement

L'étude est réalisée au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia. Elle concerne les surfaces de l'environnement hospitalier de différents services et elle est effectuée durant la période allant de février à mai 2009 (tableau N° IV).

Tableau N° IV : Sites de prélèvement

Hôpitaux	Services	Dates des prélèvements	Nombre de prélèvements
Amizour	Chirurgie générale homme/femme	01/02/2009	136
	Médecine homme/femme	14/02/2009	
	Pédiatrie et néonatalogie	21/02/2009	
	Bloc opératoire	23/02/2009	
	Réanimation	23/02/2009	
Khelil Amrane	Chirurgie viscérale homme/femme	14/03/2009	196
	Chirurgie orthopédique homme/femme	17/03/2009	
	Médecine homme/femme	22 et 28/03/2009	
	Bloc opératoire	04/04/2009	
	Réanimation	04/04/2009	
	Pédiatrie	04/04/2009	
Frantz Fanon	Pneumo-ptisiologies	20/04/2009	96
	Maxillo- faciale homme/femme	28/04/2009	
	Néphrologie	28/04/2009	
	ORL homme/femme	02/05/2009	
	Bloc opératoire ophtalmologie	10/05/2009	
	Bloc opératoire centrale	20/05/2009	

Les prélèvements ont ciblé des surfaces inertes, les plus susceptibles de rentrer en contact avec les patients, le personnel et les visiteurs (points critiques) (tableau N° V, VI et VII).

Tableau N° V : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital d'Amizour

Services	Nombre de salles	Sites de prélèvement	Nombre de prélèvements
Bloc opératoire	2	Table opératoire, scialytique, guéridon, brassard, masque O ₂ , table à instrument, poignée de robinet, bassine d'eau, berceau.	17
Réanimation	1	Lit, scope, table du scope, réanimât, bocal d'aspiration, paillasse, brassard, plateau d'intubation, respirateur et tuyauterie, table à instrument.	14
Pédiatrie et Néonatalogie	8	Berceau, lit, couveuse, table de malade, guéridon, hublot des couveuses, table de soin, balance, poignée de robinet, interrupteur électrique, poignée de porte.	25
Médecine	8	Lit, interrupteur électrique, table de malade, table de soin, poignée de porte, paillasse, guéridon, poignée de robinet.	40
Chirurgie	7	Lit, interrupteur électrique, table de malade, poignée de porte.	40

Tableau N° VI : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital Khelil Amrane

Services	Nombre de salles	Sites de prélèvement	Nombre de prélèvements
Bloc opératoire	3	Table opératoire, scialytique, masque à O ₂ , table à instrument, bocal d'aspiration, instrument d'intubation.	13
Réanimation	4	Lit, bocal d'aspiration, tuyauterie à O ₂ , poignée de porte, masque à O ₂ , table à instrument	15
Pédiatrie	7	Berceau, lit, table de malade, table de soin, poignée de porte, paillasse.	20
Médecine	19	Lit, table de malade, poignée de porte, lavabo, pillasse, guéridon, ciseau, plateau à instrument, bocal d'aspiration, masque à O ₂ , cardiogramme.	78
Chirurgie viscérale	10	Lit, interrupteur électrique, table de malade, poignée de porte, berceau, table de soins, guéridon, paillasse, instrument médical, blouse.	34
Chirurgie orthopédique	10	Lit, table de malade, table de soin, guéridon, instrument médical, blouse, table à instrument.	36

Tableau N° VII : Sites de prélèvement au niveau de l'hôpital Frantz Fanon

Services	Nombre de salles	Sites de prélèvement	Nombre de prélèvements
Bloc opératoire central	1	Table opératoire, scialytique, masque à O ₂ , table à instrument, bocal d'aspiration, instrument d'intubation, scope, porte savon, robinet, évier, instrument médical, instrument d'intubation.	9
Bloc opératoire ophtalmologique	1	Table opératoire, scialytique, plateau à instrument, poignée de porte, interrupteur électrique, tambour, instrument d'intubation, porte savon, robinet, lavabo, sol, bocal d'aspiration.	12
Néphrologie	5	Lit, table de malade, poignée de porte, guéridon, plateau à instrument, bocal d'aspiration.	12
Pneumo- ptisiologie	9	Lit, table de malade, poignée de porte, bocal d'aspiration, table de soin, guéridon, poignée de robinet, évier, porte savon, aérosol, plateau d'instrument, ciseau, flacon d'éosine.	31
Maxillo- faciale	5	Lit, table de malade, poignée de porte, porte savon, berceau.	14
ORL	2	Guéridon, poignée du robinet, porte savon, paillasse, table de soin, tuyauterie d'aspiration, matériel chirurgical, bocal d'aspiration, lit, table de malade, poignée de porte, interrupteur électrique.	18

II- Prélèvement

Un écouvillon stérile est préalablement humidifié dans un bouillon nutritif puis passé sur une zone définie (25 cm²) en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement, et toujours sur la même zone en stries perpendiculaires aux premières. L'écouvillon est introduit dans le bouillon nutritif et incubé à 37°C pendant 24h (French et *al.*, 2004).

III- Isolement et purification

A partir du bouillon d'enrichissement, on ensemence une gélose sélective de Mac Conkey contenant 4µg/ml de céfotaxime. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, les colonies d'entérobactéries (roses ou transparentes) ont fait l'objet d'une purification par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

IV- Identification des entérobactéries

L'identification des entérobactéries est basée sur les caractères culturels (taille, couleur, aspect, contour des colonies), la coloration de Gram et une identification préliminaire est réalisée par repiquage sur milieu chromogène **URIselect4** (BIO-RAD).

Les tests biochimiques clés réalisés pour l'identification des entérobactéries sont (Le Minor et Richard, 1993) :

- Fermentation des sucres (glucose et lactose) et production de gaz et de H₂S sur gélose KIA ;
- Utilisation du citrate sur milieu citrate de Simmons ;
- Etude du type fermentaire (RM et VP) sur milieu Clark et Lubs ;
- Production d'indole sur milieu eau péptonée exempte d'indole ;
- Réduction des nitrates sur bouillon nitraté ;
- Recherche d'uréase sur milieu urée-indole ;

L'identification des souches retenues a été confirmée par l'emploi d'une galerie API20E (Biomérieux, Vitek).

A partir d'une culture jeune sur milieu gélosé, une suspension bactérienne dense est préparée en dissociant 4 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est introduite dans chaque tube à l'aide d'une micropipette, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles. Les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL sont remplis alors que, uniquement les tubes sont remplis dans le cas des autres tests. En ce qui concerne les tests ADH, LDC, ODC, URE et H₂S, leurs cupules sont remplies avec de l'huile de vaseline stérile pour créer une anaérobiose. La galerie est placée dans son support dont les alvéoles sont remplies d'eau, refermée par un couvercle puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Dans le cas où 03 tests ou plus sont positifs, on note sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis on révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, VP et indole). L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification Api-Expression (ATB 1525, Biomérieux).

V- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

La sensibilité des souches isolées est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2009).

Une suspension bactérienne est préparée en dissociant 4 à 5 colonies dans 3 ml d'eau physiologique, puis une dilution 10^{-2} est réalisée (correspondant à 10^6 UFC/ml).

Un antibiogramme est réalisé afin de déterminer la sensibilité des souches d'entérobactéries identifiées vis-à-vis de deux céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et céftazidime). Les souches présentant une résistance à ces dernières sont testées une deuxième fois vis-à-vis d'autres antibiotiques appartenant à diverses familles (tableau N° VIII).

L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) est effectuée selon les critères définis par le Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques (CA-SFM, 2009).

Tableau N° VIII : Antibiotiques testés

Antibiotiques	Symboles	Charges (μg)	Diamètres critiques		Familles
			Sensible (S)	Résistant (R)	
Céfoxitine	FOX	30	≥ 22	< 15	C2G
Céfotaxime-clavulanate	CCTX	30+10	≥ 26	< 23	C3G
Céftazidime-clavulanate	CCAZ	30+10	≥ 26	< 19	C3G
Céfotaxime	CTX	30	≥ 26	< 23	C3G
Céftazidime	CAZ	30	≥ 26	< 19	C3G
Céfépime-clavulanate	CFEP	30+10	≥ 24	< 17	C4G
Céfépime	FEP	30	≥ 24	< 17	C4G
Cefpirome	CPO	30	≥ 24	< 17	C4G
Amoxicilline- clavulanate	AMC	20+10	≥ 21	< 14	Aminopénicillines
Imipenème	IPM	10	≥ 24	< 17	Carbapénèmes
Ticarcilline	TIC	75	≥ 22	< 22	Carboxypénicillines
Ticarcilline - clavulanate	TCC	75+10	≥ 22	< 22	Carboxypénicillines
Aztréonam	ATM	30	≥ 27	< 21	Monobactame
Pipéracilline	PIP	75	≥ 18	< 18	Ureidopénicillines
Pipéracilline- tazobactam	TZP	75+10	≥ 19	< 19	Ureidopénicillines
Ciprofloxacine	CIP	5	≥ 25	< 22	Fluoroquinolones
Norfloxacine	NOR	5	≥ 25	< 22	Fluoroquinolones
Ofloxacine	OFX	5	≥ 25	< 22	Fluoroquinolones
Acide nalidixique	NAL	30	≥ 20	< 15	Quinolones
Amikacine	AMK	30	≥ 17	< 15	Aminosides
Gentamicine	GM	10 UI	≥ 16	< 16	Aminosides
Kanamycine	KAN	30 UI	≥ 17	< 15	Aminosides
Tobramycine	TOB	10	≥ 16	< 16	Aminosides
Fosfomycine	FOS	50	≥ 14	< 14	Fosfomycine
Chloramphénicol	C	30	≥ 23	< 23	Phénicol
Colistine	CS	50	≥ 15	< 15	Polypeptides
Rifampicine	RIF	30	≥ 19	< 14	Rifamycines
Thriméthoprime- sulfaméthoxazole	SXT	1,25+23,75	≥ 16	< 13	Sulfamides
Tétracycline	TET	30 UI	≥ 19	< 17	Tétracyclines

VI- Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE)

La recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) concerne les souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération : céfotaxime (CTX) et/ou céftazidime (CAZ). La démarche suivie est résumée dans le schéma suivant :

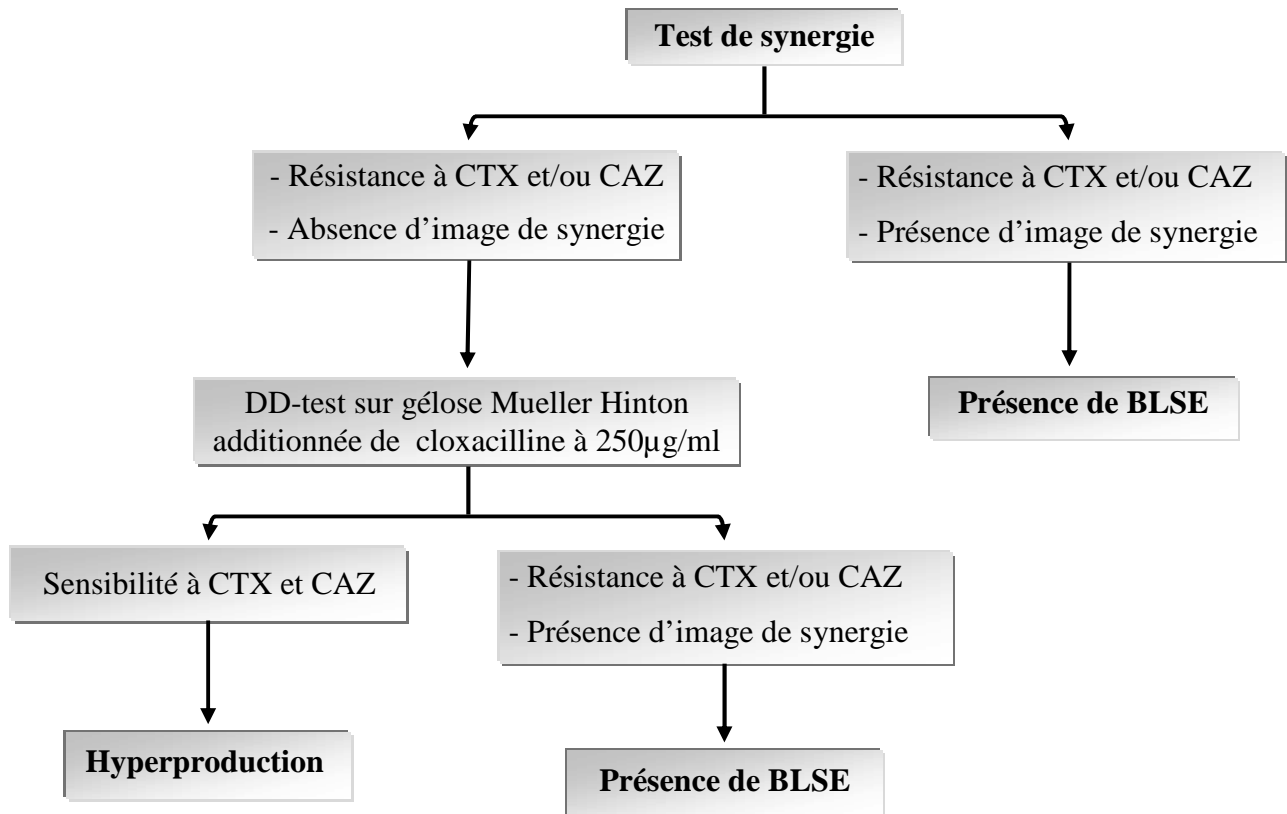


Figure 06 : Schéma de détection des BLSE

VI-1- DD-test

Le test de synergie consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, céfépime et aztréonam à une distance de 20 mm centre à centre d'un disque d'augmentin[®] (amoxicilline- acide clavulanique). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disques de céfotaxime, céftazidime, céfépime et/ou aztréonam et le disque d'augmentin[®] (Jarlier, 1988).

Dans le cas contraire, la détection de la présence de la BLSE nécessite la réalisation d'un DD-test sur gélose additionnée de cloxacilline.

VI-2- DD-test sur gélose additionnée de cloxacilline

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinases telle que *Enterobacter* sp., la présence d'une BLSE peut être masquée du faite de l'induction de la céphalosporinase par le clavulanate. La cloxacilline ajoutée au milieu Mueller Hinton inhibe très fortement cette céphalosporinase (Abid, 2007). Dans ce cas, l'antibiogramme est réalisé sur une gélose Mueller Hinton additionnée de 250 µg/ml de cloxacilline en utilisant quatre antibiotiques (CTX, CCTX, CAZ et CCAZ).

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition entre les boites avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE. Une différence ≥ 8 mm entre les diamètres des zones d'inhibition autour des disques indique une hyperproduction de céphalosporinase (Touati, 2006).

VII- PCR du gène *bla*

Deux PCR ont été réalisées dans le but de rechercher les gènes de synthèse des BLSE à savoir *bla*_{CTX-M} et *bla*_{SHV} chez les souches résistantes (tableau N° IX).

Tableau N° IX : Amorces utilisées pour la PCR du gène *bla*

Amorces	Oligonucléotides
CTXM-879-R	CTATTACAAACCGTCGGTGA
CTXM-405-F	GTGGCGATGAATAAGCTGA
CTXM-10-F	AAGGAATCCCATGGTTAA
CTXM-628-R	CCTTTCATCCATGTCACCA
SHV-1-F	<u>A</u> TGCGTTATATTCGCCTGTG
SHV-861-R	<u>T</u> TAGCGTTGCCAGTGCTCGA

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur selon la programmation présentée dans le tableau ci-dessous. Les produits d'amplification ont été séquencés.

Tableau N° X : Programme PCR

Étapes		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	5 mn
30 cycles	dénaturation	94°C	30 s
	hybridation	51°C	30 s
	élongation	72°C	30 s
Elongation finale		72°C	5mn

Remarque : La PCR a été réalisée au laboratoire de bactériologie du CHU de Reims, France par le Dr. Touati.

VIII- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La recherche des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée vis-à-vis de céfotaxime, céftazidime, céfépime, aztréonam et cefpirome.

Une solution mère est préparée pour chacun des antibiotiques à une concentration de 2mg/ml dans de l'eau distillée stérile. Des volumes bien définis de cette solution mère sont prélevés et ajoutés à un volume d'une gélose Mueller Hinton en surfusion afin d'avoir des concentrations croissantes à raison de 2 comme le montre le tableau ci dessous.

Tableau N° XI : Préparation des concentrations d'antibiotiques

Concentration finale d'ATB en µg/ml	8	16	32	64	128
Volume de la solution mère en ml	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Volume de la gélose Mueller Hinton en ml	99,6	99,2	98,4	96,8	93,6

Après homogénéisation, une série de boîtes de Pétri est coulée pour chaque concentration puis séchée à 37°C/24h.

A partir d'une suspension de 10^8 UFC/ml, une dilution de 10^{-2} est réalisée puis 10µl de la suspension bactérienne sont déposés en spot (soit un inoculum de 10^4 UFC/spot). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible à l'œil nu.

IX- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds

Les métaux lourds utilisés sont choisis selon une étude faite par Casas, (2005). Ces métaux sont utilisés sous forme de sels hydrosolubles.

Pour évaluer la sensibilité des souches d'entérobactéries identifiées, nous avons tenu compte des travaux de Dhakephalkar et Chopade (1994). Les souches qui poussent à des concentrations supérieures aux valeurs critiques (tableau N° XII) sont considérées résistantes.

Tableau N° XII : Concentrations critiques exprimant une résistance ou une sensibilité aux métaux lourds (Dhakephalkar et Chopade, 1994)

Métaux	Concentrations critiques (mM)	Concentrations critiques (µg/ml) (Cc)
Hg	0,1	20,06
Cu	10	635
Zn	10	654
Pb	10	2072
Cd	1	112,4

CMI > Cc : Souche résistante, CMI < Cc : Souche sensible

IX- 1- Préparation des solutions initiales en sels de métaux.

Les concentrations en sels de métaux utilisées pour la préparation des solutions mères sont les suivantes :

- Sulfate de cuivre (II) : $[\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}] = 0,5 \text{ g/ml}$
- Acétate (II) de plomb : $[\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}] = 0,1 \text{ g/ml}$
- Sulfate de cadmium : $[3\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}] = 0,1 \text{ g/ml}$
- Chlorure de mercure (II) : $[\text{HgCl}_2] = 10 \text{ mg/ml}$
- Sulfate de zinc : $[\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}] = 0,5 \text{ g/ml}$

IX-2- Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu solide

A partir des solutions initiales de sels de métaux lourds, des volumes bien déterminés sont prélevés et ajustés avec le milieu Mueller Hinton en surfusion à un volume final de 140 ml (annexe 03). Un exemple de concentrations et de volumes nécessaires pour la préparation des différentes solutions est donné dans le tableau N° XIII.

Tableau N° XIII : Préparation des concentrations du chlorure de mercure

[Solution mère] = 10mg/ml.

Concentrations finales en sels de métaux en µg/ml	2,5	5	10	20	40	80	160	320
Volumes de la solution mère en ml	0,034	0,068	0,136	0,271	0,541	1,083	2,166	4,333
Volumes de la gélose Mueller Hinton en ml	99,966	99,932	99,864	99,729	99,459	98,917	97,834	95,667

Dans une éprouvette stérile de 100 ml, des volumes de la solution mère sont introduits puis compléter à 100 ml avec de la gélose Mueller Hinton en surfusion pour avoir les concentrations finales voulues. Le milieu est ensuite reparti dans des flacons puis autoclavé à 120°C/20min.

Après homogénéisation, une série de boîtes de Pétri est coulée pour chaque concentration puis séchée à 37°C/24h.

Une suspension bactérienne préparée dans les mêmes conditions que pour l'antibiogramme est utilisée pour ensemercer en spot et à raison de 10µl les différents milieux. Ainsi, trois répétitions sont réalisées pour chacune des concentrations.

Un témoin positif ne contenant que la gélose Mueller Hinton est ensemençé avec les mêmes suspensions bactériennes.

Après incubation à 37°C/24h, la présence ou l'absence d'une croissance est notée pour chaque souche et pour chaque concentration en sels de métaux. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice correspondant pour chaque métal est déterminée par la plus faible concentration inhibant la croissance des souches étudiées (Deshpande et *al.*, 1993).

Les différentes concentrations en sels de métaux utilisées sont représentées dans le tableau N° XIV.

Tableau N° XIV : Différentes concentrations de sels métalliques

Métaux	Concentrations (µg/ml)							
Hg⁺²	2,5	5	10	20	40	80	160	320
Cu⁺²	100	200	400	800	1600	3200	6400	
Pb⁺²	400	800	1600	2400	3200	4000		
Cd⁺²	12,5	25	50	100	200	400	800	
Zn⁺²	50	100	200	400	800	1600		

X- Transfert de la résistance par conjugaison

Les souches productrices de BLSE et résistantes au mercure ont été utilisées comme souches donatrices et une souche de référence appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée est utilisée comme souche réceptrice. Le transfert des gènes de résistances par conjugaison a été réalisé par la méthode en milieu liquide (Touati, 2006).

Souches donatrices : *Enterobacter cloacae* (707, 745, 739) et *Klebsiella pneumoniae* (714) résistantes à l'amoxicilline et intermédiaires à la rifampicine.

Souche réceptrice : *Proteus mirabilis* résistant à la rifampicine et sensible à tout les autres antibiotiques.

Le transfert des gènes de résistance est réalisé comme suit :

- Une culture de la souche réceptrice et donatrice est réalisée dans 10ml de bouillon trypticase soja (TSB) et incubée une nuit dans un bain-marie sous agitation.
- On prélève 200µl de la culture de la souche réceptrice et donatrice qu'on ajoute à 10ml de bouillon trypticase soja (dilution de 1/ 50) puis on l'incube à 37°C pendant 3 heures.
- Dans un tube stérile, on mélange 1ml de la culture de la souche réceptrice avec 1ml de la culture de la souche donatrice et 1ml du bouillon trypticase soja (un rapport V/V/V).
- On incube le mélange et les témoins à 37°C pendant 2 heures.
- Le milieu de sélection des transconjugants est la gélose Mueller Hinton additionnée de deux antibiotiques ; l'un est l'amoxicilline à une concentration finale de 128µg/ml, qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice et l'autre la rifampicine à une concentration finale de 500 µg/ml, qui est un caractère chromosomique de la souche réceptrice.
- Des boites témoins contenant de la gélose Muller Hinton additionnée de rifampicine (concentration finale de 500 µg/ml) et de l'amoxicilline (concentration finale de 128 µg/ml) sont préparées afin de vérifier la sélectivité du milieu.
- On étale 200µl du mélange avec un râteau étaleur sur la surface des boites de sélection et on ensemence la souche réceptrice et donatrice séparément sur les boites témoins.
- On incube les boites témoins et de sélection à 37°C pendant 18 heures.

L'étude de la résistance des tansconjuguants aux antibiotiques est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard (Touati, 2006). Dans le cas des métaux lourds, la méthode utilisée est la technique de dilution en milieu solide.

Résultats et Discussions

I- Isolement et identification	51
II- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques	55
II-1- Sensibilité au CTX et CAZ	55
II-2- Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE)	56
II-2-1- DD-test	56
II-2-2- DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline.....	56
II-3- Sensibilité des souches BLSE aux antibiotiques.....	58
II-3-1- β -lactamines	58
II-3-2- Aminosides	59
II-3-3- Quinolones	61
II-3-4- Autres antibiotiques	62
II-4- Répartition des souches BLSE selon leur origine d'isolement	64
II-5- PCR du gène <i>bla</i>	66
II-6- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	67
III- Résistance des entérobactéries aux métaux lourds	69
III-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	69
III-2- Phénotypes de résistance aux métaux lourds	74
III-2-1- Métallotypes des entérobactéries productrices de BLSE	76
III-3- Corésistance des BLSE aux antibiotiques et aux métaux lourds	77
IV-Transfert de gènes de résistance par conjugaison	80

Résultats & Discussions

I- Isolement et identification

Nous avons effectué 428 prélèvements sur les différentes surfaces de l'environnement hospitalier de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia, durant la période allant de Février à Mai 2009. La répartition de ces prélèvements par hôpital et par services est représentée dans le tableau N° XV.

Tableau N° XV : Répartition des prélèvements par hôpital et par services

Hôpital d'Amizour		Hôpital Khelil Amrane		Hôpital Frantz Fanon	
Services	Nombre de prélèvements	Services	Nombre de prélèvements	Services	Nombre de prélèvements
Chirurgie H	20	Chirurgie V H	14	Pneumo-phtisio H	13
Chirurgie F	20	Chirurgie V F	20	Pneumo-phtisio F	18
Médecine H	20	Chirurgie O H	23	Maxillo-facial H	09
Médecine F	20	Chirurgie O F	13	Maxillo-facial F	05
Pédiatrie	18	Médecine H	30	Néphrologie H	09
		Médecine F	48	Néphrologie F	03
Néonatalogie	7	Pédiatrie	20	BOP centrale	09
Réanimation	14	Réanimation	15	ORL H	13
				ORL F	05
BOP	17	BOP	13	Ophtalmologie	12
Total hôpital	136	Total hôpital	196	Total hôpital	96
Total	428				

H : homme ; F : femme ; O : orthopédique ; V : viscérale ; BOP : bloc opératoire

L'identification des souches isolées a permis, sur la base des caractères morphologiques et biochimiques (annexe 04), de caractériser 62 souches comme étant des entérobactéries. Il est à signaler que d'autres bacilles à Gram négatif ont été isolés dont *Acinetobacter* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Liassine (2000) qui a montré que les microorganismes de l'environnement hospitalier sont extrêmement variés (bactéries, levures, moisissures, virus et parasites) et les bactéries pathogènes à Gram négatif retrouvées dans cet environnement appartiennent à différents groupes bactériens (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*) (Liassine, 2000).

Sur les 62 souches d'entérobactéries identifiées, 38 souches sont isolées de l'hôpital Khelil Amrane, 15 de l'hôpital d'Amizour et 9 de l'hôpital Frantz Fanon (tableau XVI).

Tableau N° XVI : Nombre d'entérobactéries isolées par services au niveau de chaque hôpital

Hôpital d'Amizour		Hôpital Khelil Amrane		Hôpital Frantz Fanon	
Services	Nombre d'entérobactéries	Services	Nombre d'entérobactéries	Services	Nombre d'entérobactéries
Chirurgie	3	Chirurgie	14	Pneumo-phtisio	3
Médecine	5	Médecine	8	Maxillo-facial	3
Pédiatrie	3	Pédiatrie	9	Néphrologie	0
Néonatalogie	2	Réanimation	6	BOP centrale	1
Réanimation	2	BOP	1	ORL	2
BOP	0			Ophthalmologie	0
Total	15	Total	38	Total	9

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent la présence des entérobactéries dans la plupart des services des trois hôpitaux étudiés, toutefois, leur répartition apparaît hétérogène. En effet, la répartition des entérobactéries par services (figure 07) montre que le service chirurgie contient le nombre le plus élevé de souches (22) suivi par le service médecine (16) et pédiatrie (14) alors que le bloc opératoire semble être le moins contaminé (2), cela serait dû au respect rigoureux des règles d'hygiène ce qui permet également de réduire sensiblement les risques d'infections (Hoet, 1998). De même, l'utilisation d'un système d'efflux laminaire ainsi que les UV contribuent à cette réduction.

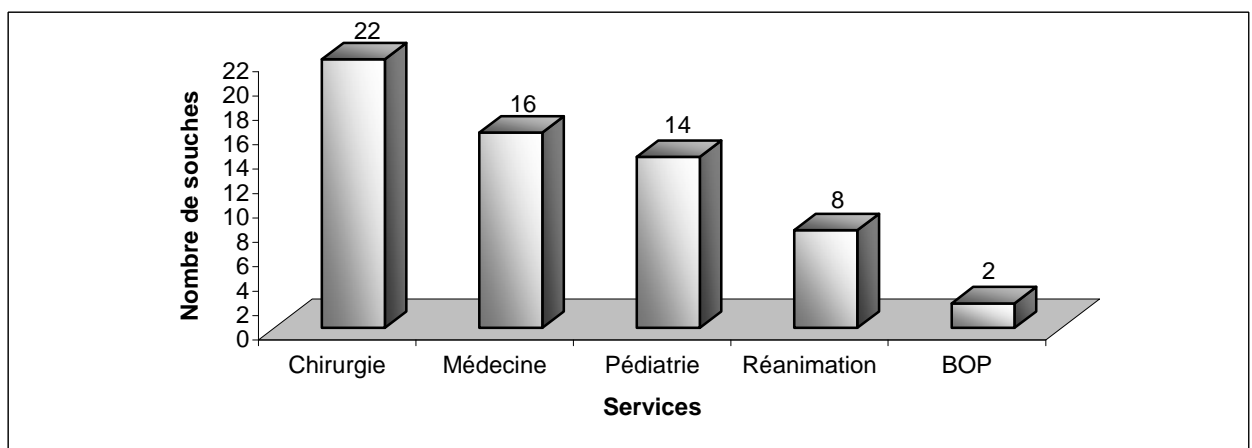


Figure 07 : Répartition des souches d'entérobactéries par services

Chirurgie : chirurgie viscérale, orthopédique, maxillo-faciale, ORL et ophtalmologie ; Médecine : médecine, pneumo-phtisiologie et néphrologie

La réanimation prend en charge des patients avec des pathologies extrêmement sévères qui mettent en jeu leurs pronostiques vitaux et qui sont soumis à un traitement aux antibiotiques qui modifient leur flore. L'environnement proche de ces malades colonisés et/ou infectés est souvent contaminé ce qui justifie la présence des entérobactéries sur les surfaces de ces services (Girou et Fagon, 1998).

Les bactéries Gram négatives, bien qu'elles proviennent souvent des patients eux-mêmes, peuvent survivre dans différentes niches environnementales. Elles prolifèrent mieux sur les équipements et les zones humides et mal nettoyées, désinfectées ou stérilisées (Dancer, 1999). Ce constat peut expliquer les résultats obtenus (tableau N° XVII).

Tableau N° XVII : Distribution des souches par sites de prélèvement

Sites de prélèvement	Nombre de souches isolées
Lit	27
Table	16
Paillasse	7
Bocal d'aspiration	4
Evier	2
Poignée de porte	2
Tuyauterie à O2	2
Porte savon	1
Cardiogramme	1

La fréquence élevée des souches d'entérobactéries isolées à partir des draps de lits de malades (27/62) et des tables (16/62) suggère l'implication de la flore endogène des patients dans la contamination de ces surfaces inanimées (hétéro ou auto-contamination). Selon Barbut et Neyme (2006), les surfaces peuvent être contaminées par des microorganismes issus du patient lui-même (infectés ou simplement colonisés). La localisation et le type d'infection (blessure ou infection urinaire) peut aussi jouer un rôle dans la contamination et la transmission des microorganismes sur des surfaces situées à proximité du malade y compris le linge du lit et les tables (Mota et Edberg, 2002).

Wheeldon et *al.* (2008) ont rapporté que la flore isolée des surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient directement ou indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains du personnel peut constituer un réservoir microbien et que les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas obligatoirement pathogènes mais, la flore issue de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou la flore des muqueuses peut être responsables d'infection liées aux soins.

En plus des souches isolées de l'environnement proche du malade, d'autres souches sont isolées à partir des paillasses des salles de soin (7 souches) et de différents matériel médical (tuyauterie à oxygène, bocal d'aspiration et cardiogramme). Selon Al-Hamad et Maxwell (2008), le personnel est le principal agent par lequel les patients deviennent infectés; des microorganismes sont transmis par le personnel d'un patient à un autre ou de l'environnement aux patients. L'hygiène des mains est probablement le facteur le plus important de prévention contre l'acquisition des infections hospitalières.

La présence des entérobactéries sur les surfaces nécessitant un nettoyage quotidien comme les surfaces plates des tables situées à proximité du malade, les paillasses présentent dans les salles de soins, les poignées de porte ou bien sur le matériel médical peut être due à une défaillance du procédé de nettoyage ou à la perte de l'efficacité des produits utilisés (développement d'une résistance aux désinfectants). Rutala et Weber (1999) ont signalé que le degré de désinfection est affecté par un certain nombre de facteurs, dont chacun peut annuler ou limiter l'efficacité du processus. L'inaccessibilité ou la négligence de certaines surfaces telles que les dispositifs médicaux (bocal d'aspiration et la tuyauterie d'oxygène) contribuent à la surcontamination de ces derniers.

Dans le milieu hospitalier, les isolats cliniques sont moins sensibles à de nombreux désinfectants couramment utilisés que le sont d'autres isolats. Les bactéries Gram négatives sont généralement plus résistantes que les bactéries Gram positives tels que les staphylocoques et les entérocoques (Russell, 1998). La rotation ou l'alternance des produits désinfectants est jugée nécessaire pour prévenir l'apparition éventuelle de résistance des bactéries aux désinfectants (Rouillon et *al.*, 2006).

II- Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

II-1- Sensibilité au CTX et CAZ

Les 62 souches d'entérobactéries isolées des différentes surfaces de l'environnement hospitalier (annexe 05) des trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia sont étudiées pour leur résistance vis-à-vis du céfotaxime et céftazidime. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N° XVIII : Antibiogramme des souches d'entérobactéries isolées des surfaces de l'environnement hospitalier

Code	CTX	CAZ	Code	CTX	CAZ	Code	CTX	CAZ
701	S	S	726	S	S	747	R	R
702	S	S	727	R	R	752	R	R
704	S	S	728	S	S	754	R	R
705	S	S	729	S	S	755	I	R
707	I	I	730	R	R	756	R	R
708	S	S	731	R	R	757	R	R
709	R	R	732	R	R	758	R	R
710	I	I	733	I	I	760	S	S
712	S	R	734	S	R	762	I	I
713	S	S	735	S	S	763	R	R
714	I	I	736	S	S	764	R	R
715	I	I	737	R	R	765	S	S
716	R	R	738	S	R	766	S	S
717	R	R	739	R	R	767	S	S
719	S	S	740	S	S	768	S	S
720	R	R	741	S	S	769	S	S
721	S	S	742	S	S	770	S	S
722	R	R	743	R	R	771	S	S
723	S	S	744	S	S	772	S	S
724	R	R	745	R	R	773	S	S
725	S	S	746	S	R			

Céfotaxime : CTX, Céftazidime : CAZ, R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire.

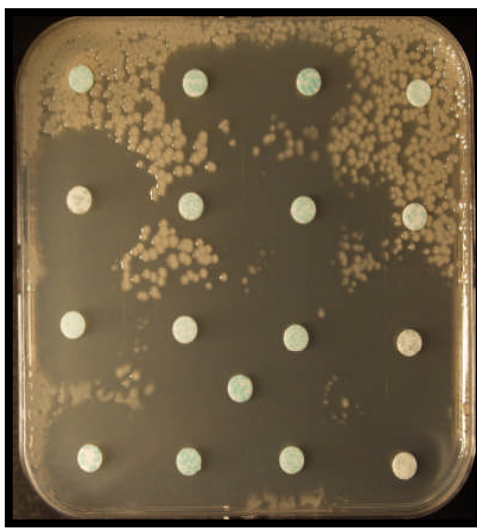
Sur les 62 souches isolées, 33 souches sont résistantes au céfotaxime et/ou céftazidime dont 23 souches sont isolées de l'hôpital Khelil Amrane, 7 de l'hôpital d'Amizour et 3 sont isolées de l'hôpital Frantz Fanon. 53,23 % (33 souches) des souches d'entérobactéries sont résistantes au céftazidime, 46,77 % (29 souches) sont résistantes au céfotaxime et 46,77 % (29 souches) sont résistantes aux deux molécules.

II-2- Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE)

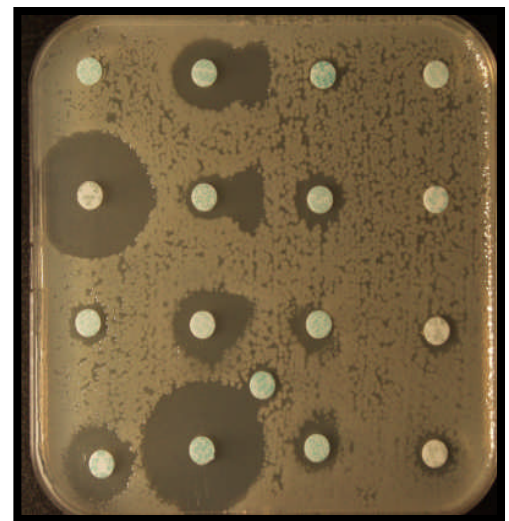
Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont recherchées pour les souches présentant une résistance au céftazidime et/ou céfotaxime.

II-2- 1-DD-test

Le test de synergie réalisé sur les 33 souches d'entérobactéries a permis d'observer une image de synergie (figure 08) pour 16 souches (tableau N° XIX), ce qui se traduit par une augmentation du diamètre des zones d'inhibition au tour des disques de C3G et C4G et/ou aztréonam. Celles-ci possèdent donc une BLSE.



715 : *K. pneumoniae*



730 : *E. cloacea*

Figure 08 : Image de synergie

II-2-2- DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

Les souches ne présentant pas d'image de synergie sont testées en présence de la cloxacilline à une concentration de 250 μ g/ml. Les résultats obtenus montrent que 17/33 souches sont hyperproductrices de céphalosporinases (tableau N° XIX).

Tableau N° XIX : Résultats de la recherche des BLSE

Caractères	Nombre de souches	Code des souches
Image de synergie : BLSE	16	714, 732, 733, 734, 745, 746, 707, 710, 712, 715, 716, 722, 730, 737, 738, 739
Hyperproduction	17	709, 717, 720, 724, 727, 731, 732, 743, 747, 752, 754, 755, 756, 757, 758, 763, 764

La contamination des surfaces par des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (16 souches BLSE) représente 3,74 % des 428 prélèvements effectués. Ce pourcentage est supérieur à celui trouvé par Abid et *al.* (2007) dans trois hôpitaux de la wilaya d'Annaba (Algérie) et qui est de 1,6 % et inférieur à celui trouvé par Touati et *al.* (2007a) dans deux hôpitaux de la wilaya de Bejaia (9 %) et par D'agata et *al.* (1999) dans un hôpital en Israël (5 %).

La contamination des surfaces de l'environnement par des entérobactéries BLSE souligne la nécessité de conserver toutes les surfaces inanimées entourant les patients aussi sec que possible, en particulier dans les unités de soins intensifs, où la possibilité de transmission croisée des agents pathogènes d'origine nosocomiale via les mains du personnel est particulièrement élevée (Kac et *al.*, 2004).

L'utilisation de la galerie API20E a permis d'identifier deux espèces à savoir *K. pneumoniae* et *E. cloacae* dont la majorité des souches (14/16) appartiennent à l'espèce *E. cloacae* (tableau N° XX).

Tableau N° XX : Résultats des galeries API20E

Code des souches	Code des galeries API20E	Espèces identifiées	Code des souches	Code des galeries API20E	Espèces identifiées
707	3307773	<i>E. cloacae</i>	733	3305773	<i>E. cloacae</i>
710	3325773	<i>E. cloacae</i>	734	3305773	<i>E. cloacae</i>
712	3305773	<i>E. cloacae</i>	737	3205773	<i>E. cloacae</i>
714	5205773	<i>K. pneumoniae</i>	738	3305773	<i>E. cloacae</i>
715	5205773	<i>K. pneumoniae</i>	739	3305773	<i>E. cloacae</i>
716	3305773	<i>E. cloacae</i>	745	3305773	<i>E. cloacae</i>
722	3205773	<i>E. cloacae</i>	746	1305773	<i>E. cloacae</i>
730	3205773	<i>E. cloacae</i>	762	3305773	<i>E. cloacae</i>

II-3- Sensibilité des souches BLSE aux antibiotiques

II-3-1- β -lactamines

Les 16 souches BLSE présentent une résistance variable vis-à-vis des β -lactamines (tableau N° XXI). En plus de leur résistance au céfotaxime et au céftazidime, elles sont toutes résistantes à l'aztréonam (ATM), à l'augmentin® (AMC), à la pipéracilline (PIP) et à la ticarcilline (TIC). Ce même constat a été rapporté dans une étude réalisée par Touati et *al.* (2007a) sur les surfaces de l'environnement hospitalier, au niveau des hôpitaux de la wilaya de Bejaia.

Dans une autre étude réalisée par ces mêmes auteurs sur la contamination de l'air de l'hôpital d'Amizour (Touati et *al.*, 2007b), une résistance de deux souches de *K. pneumoniae* au céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ticarcilline et amoxicilline a été décrite.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que 75 % et 68,75 % des souches sont résistantes aux céphalosporines de quatrième génération (CPO et FEP respectivement) alors que dans les deux précédentes études réalisées par Touati et *al.* (2007a, b), toutes les souches y sont résistantes.

Tableau N° XXI : Phénotypes de résistance aux β -lactamines

Code	Espèces	FEP	ATM	CPO	AMC	CFEP	CCTX	CCAZ	PIP	TCC	FOX	TZP	TIC
707	<i>E. cloacae</i>	I	I	R	R	S	S	S	R	I	R	S	R
710	<i>E. cloacae</i>	I	I	R	R	S	S	S	R	I	R	S	R
712	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	I	R
714	<i>K.pneumoniae</i>	I	I	I	I	S	S	S	R	S	S	S	R
715	<i>K.pneumoniae</i>	I	I	I	I	S	S	S	R	S	S	S	R
716	<i>E. cloacae</i>	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
722	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R
730	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R
733	<i>E. cloacae</i>	I	I	R	R	S	R	R	R	I	R	S	R
734	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	I	R
737	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S	R
738	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R
739	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S	R
745	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R
746	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	I	R
762	<i>E. cloacae</i>	I	I	R	R	S	S	I	R	I	R	S	R

L'addition de l'acide clavulanique au céfépime (FEP) permet de restaurer son efficacité puisque toutes les souches sont devenues sensibles. L'association entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération ; CCTX (13,33 %) et CCAZ (40

%) améliore l'activité mieux que l'association avec la ticarcilline (86,67%). Toutes les souches isolées sont sensibles à l'imipènème (figure 09).

La réduction de la perméabilité de la membrane externe aux β -lactamines, suite à la perte de porines ou à des modifications dans leur structure peut favoriser la résistance à ces agents. La déficience en porine est un facteur contribuant à la résistance aux β -lactamines (y compris les plus récentes générations de céphalosporines) chez un certain nombre d'organismes, notamment *E. coli*, *Proteus* spp., *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. dysenteriae*, *N. gonorrhoeae*, *S. marcescens* et *H. pylori*, mais il est plus souvent observé chez *K. pneumoniae* et *Enterobacter* spp. généralement en conjonction avec l'expression d'une β -lactamases.

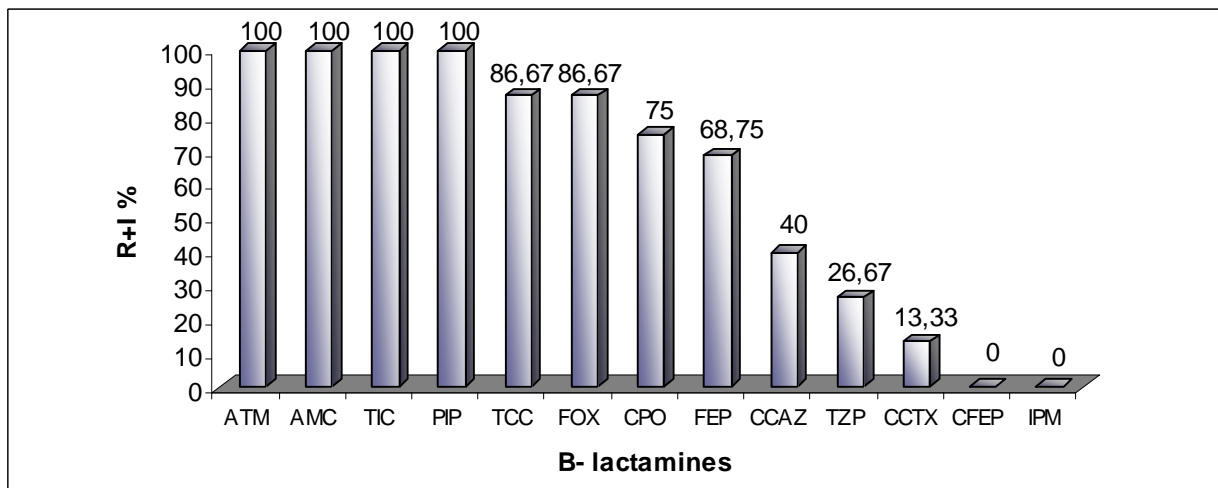


Figure 09 : Taux de résistances des souches BLSE aux β -lactamines

II-3-2- Aminosides

L'étude de la résistance des souches d'entérobactéries BLSE aux aminosides montre que toutes les souches sont résistantes à la gentamicine et à la tobramycine et 93,75% sont résistantes à la kanamycine (figure 10).

L'amikacine reste efficace avec un taux de résistance de 18,75%. Ce taux est supérieur à celui rapporté par Lockhart et *al.* (2007) où toutes les souches d'entérobactéries qu'ils ont étudié dont *K. pneumoniae* et *E. cloacae* sont totalement sensibles à cet antibiotique.

Biendo et *al.* (2008) ont rapporté des taux de résistance à l'amikacine, gentamicine et tobramycine respectivement de 37,7%, 52,4 % et 75,4% chez 61 souches de *E. cloacae* BLSE. Ces taux sont inférieurs à ceux que nous avons obtenus pour les deux dernières molécules où toutes les souches de cette espèce sont résistantes et sont supérieurs dans le cas de l'amikacine.

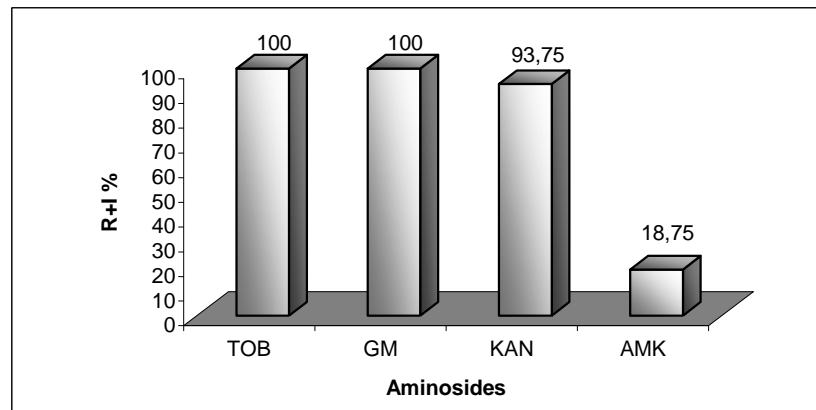


Figure 10 : Taux de résistance des souches BLSE aux aminosides

Les phénotypes de résistance et les mécanismes probables aux aminosides des souches d'entérobactéries isolées sont déduits selon leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques testés (tableau N° XXII). Le mécanisme de résistance aux aminosides le plus significatif chez des souches cliniques est la modification enzymatique de l'antibiotique, le profil exact de résistance dépend de l'aminoside utilisé (Georgopadaku, 2008).

Tableau N° XXII : Phénotypes de résistance aux aminosides

Code	Espèces	KAN	TOB	AMK	GM	Phénotypes
707	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	R	KAN TOB GM
710	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM
712	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM
714	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	S	R	KAN TOB GM
715	<i>K. pneumoniae</i>	R	I	S	R	KAN TOB GM
716	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	KAN TOB AMK GM
722	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM
730	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	KAN TOB AMK GM
733	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	R	KAN TOB GM
734	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM
737	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	KAN TOB AMK GM
738	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	TOB GM
739	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	R	KAN TOB GM
745	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	R	KAN TOB GM
746	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM
762	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	R	KAN TOB GM

Les souches d'*E. cloacae* présentent 03 phénotypes de résistance aux aminosides, dont le phénotype dominant (KAN-TOB-GM) est partagé avec l'espèce *K. pneumoniae*. Cette variabilité est aussi observée dans différents hôpitaux (en Algérie) par Iabadene et al. (2008)

pour des souches d'*E. cloacae* d'origine pathologiques mais avec une dominance du phénotype KAN-GEN-TOB-AMK.

Le phénotype KAN-TOB-GM est probablement dû à la modification de l'antibiotique soit par une *O*-adényltransférase (ANT(2'')-Ia) ou par une *N*-acétyltransférase (AAC(3)-Ia). Ces modifications empêchent la liaison de l'aminoside à sa cible (ARNr16s) (Wright, 2008).

II-3-3- Quinolones

La plupart des souches isolées sont résistantes à l'acide nalidixique et à l'ofloxacine avec respectivement 68,75% et 62,5%. Le pourcentage de résistance de ces souches vis-à-vis de norfloxacine et ciprofloxacine est de 43,75% (figure 11).

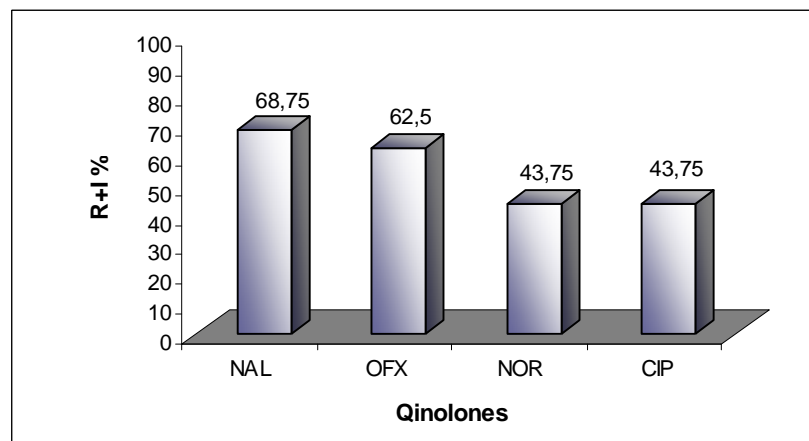


Figure 11 : Taux de résistance des souches BLSE aux quinolones

Deux souches de *K. pneumoniae* et trois souches d'*E. cloacae* (716, 730 et 737) sont totalement sensibles aux 1^{ère} et 2^{ème} génération de quinolones (tableau N° XXIII). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Gaillot et *al.* (1998) sur des souches de *K. pneumoniae* isolées d'un gel d'échographie et à ceux rapportés par Touati et *al.* (2008) sur deux souches d'*E. cloacae* isolées de l'environnement (stéthoscope) et d'une infection urinaire.

La majorité des souches d'*E. cloacae* sont résistantes aux quinolones et fluoroquinolones et présentent le profil NAL-NOR-CIP. Ces résultats sont similaires avec ceux rapportés par Touati et *al.* (2008).

Tableau N° XXIII : Phénotypes de résistance aux quinolones

Code	Espèces	NAL	NOR	OFX	CIP	Phénotypes
707	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	NAL NOR OFX CIP
710	<i>E. cloacae</i>	I	R	I	R	NAL NOR OFX CIP
712	<i>E. cloacae</i>	I	S	I	S	NAL OFX
714	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	Sensible
715	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	Sensible
716	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	Sensible
722	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	NAL NOR OFX CIP
730	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	Sensible
733	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	NAL NOR OFX CIP
734	<i>E. cloacae</i>	I	S	I	S	NAL OFX
737	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	Sensible
738	<i>E. cloacae</i>	I	S	R	S	NAL OFX
739	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	NAL NOR OFX CIP
745	<i>E. cloacae</i>	I	R	R	R	NAL NOR OFX CIP
746	<i>E. cloacae</i>	I	S	I	S	NAL OFX
762	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	R	NAL NOR CIP
764	<i>E. cloacae</i>	I	R	I	R	NAL NOR OFX CIP

NAL : acide nalidixique, NOR : norfloxacin, OFX : ofloxacin, CIP : ciprofloxacine

II-3-4- Autres antibiotiques

La réponse des souches BLSE à la rifampicine est indifférente puisque toutes les souches sont résistantes par contre, elles sont toutes sensibles à la colistine et à la fosfomycine.

Les pourcentages de résistance vis-à-vis de la tétracycline, du chloramphénicol et du triméthoprime-sulfaméthoxazole sont respectivement de 43,75%, 68,75 % et 87,5 % (figure 12). Les principaux mécanismes impliqués dans la résistance à ces substances chez les souches d'entérobactéries d'origine clinique sont, respectivement, le système d'efflux inductible par lequel la concentration intracellulaire de ces molécules soit réduite, l'inactivation de ces molécules par acétylation et l'altération de la cible (Georgopapadakou, 2008).

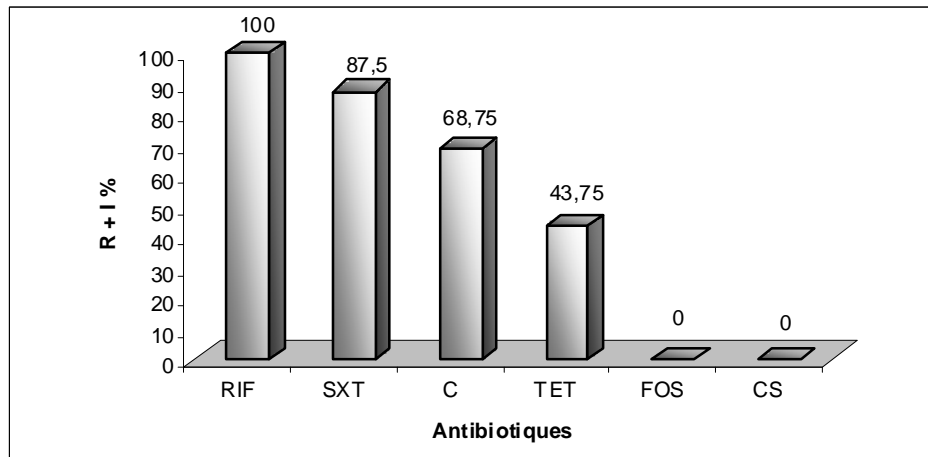


Figure 12 : Taux de résistance des souches BLSE aux autres antibiotiques

Les souches de *K. pneumoniae* sont sensibles à tous les antibiotiques testés à l'exception de la rifampicine, contrairement aux résultats observés par Abbassi et *al.* (2008) où des souches *K. pneumoniae* ont montrée une résistante à la tétracycline et au triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Les principales classes d'antibiotiques actuellement utilisées pour traiter les infections dues aux entérobactéries sont les β -lactamines, les quinolones, les aminosides, les tétracyclines et les sulfamides (Georgopadakou, 2008). Les souches produisant des BLSE montrent parfois une résistance à une gamme encore plus large de β -lactamines en raison de la coproduction d'AmpC.

La réduction de l'usage des céphalosporines de troisième génération limite la prévalence des microorganismes producteurs de BLSE. La résistance aux β -lactamines conférées par les BLSE est fréquemment associée à la résistance aux différentes autres classes d'antibiotiques telles que les céphamycines, fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines et triméthoprim / sulfaméthoxazole (Falagas et *al.*, 2009).

II-4- Répartition des souches BLSE selon leur origine d'isolement

La répartition des souches BLSE sur les différentes surfaces de l'environnement hospitalier n'est pas homogène, elle varie en fonction des hôpitaux et en fonction des services.

Au niveau de l'hôpital d'Amizour, les souches BLSE sont isolées seulement au niveau du service médecine (femme et homme) et du service chirurgie femme. La contamination des surfaces de l'hôpital Khelil Amrane touche tous les services et présente une variabilité entre les services et même au niveau du même service (femme et homme). Trois souches sont isolées à partir des surfaces des services chirurgie viscérale et pédiatrie et deux souches au niveau du service réanimation. Les services Médecine femme, chirurgie orthopédique (femme et homme) et le bloc opératoire présentent chacun une seule souche.

Abid et *al.*, (2007) ont constaté une variabilité, selon le type du service hospitalier, dans la population des souches de *K. pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre élargi isolées de différentes pathologies humaines et des surfaces de l'environnement hospitalier.

Le tableau N° XXIV montre la répartition des souches BLSE selon leur origine d'isolement. On constate que les sites les plus contaminés sont les lits et les tables de malades (08 et 04 souches respectivement). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Saïdani et *al.* (2006), qui ont signalé l'omniprésence des bactéries multirésistantes dans tous les services de l'hôpital Charles-Nicolle en Tunisie. La proportion de ces bactéries varie selon les hôpitaux et surtout selon le type d'activité des services hospitaliers ainsi que, les habitudes de prescription. Elle est le reflet de la qualité de soins dans une structure hospitalière donnée et témoigne d'une déficience générale des mesures d'hygiène (Saïdani et *al.*, 2006).

Tableau N° XXIV : Répartition des souches résistantes par hôpital et par service

Code	Hôpital	Services	Salles	Sites de prélèvements	Observations	Espèces identifiées
707	Amizour	CHF	1	Table du lit 1	Propre avec poussière	<i>E. cloacae</i>
714		MH	5	Lit 7	Draps changé depuis 7 jours	<i>K. pneumoniae</i>
715		MF	1	Lit 1	Draps changé depuis 4 jours	<i>K. pneumoniae</i>
716			3	Lit 3	Draps changé depuis 13 jours	<i>E. cloacae</i>
739	Khalil Amrane	REA	3	Lit 1	Draps changé depuis 15 jours	<i>E. cloacae</i>
712			4	Tuyauteries à O ₂	Néant	<i>E. cloacae</i>
722		CHVF	5	Lit 5	Draps changé depuis 3 jours	<i>E. cloacae</i>
737			3	Table du lit 3	Sale avec poussière	<i>E. cloacae</i>
730			4	Lit 4	Draps changé depuis 4 jours	<i>E. cloacae</i>
733		MF	9	Table du lit 18	Propre	<i>E. cloacae</i>
734		CHOH	8	Table du lit 8	Propre	<i>E. cloacae</i>
738		PED	Salle de soin	Paillasse	Néant	<i>E. cloacae</i>
710			3	Berceau bébé	Néant	<i>E. cloacae</i>
746			3	Lit 3	Draps changé depuis 2 jours	<i>E. cloacae</i>
745		CHOF	5	Lit 2	Draps changé depuis 2 jours	<i>E. cloacae</i>
762		BOP	2	Bocal d'aspiration	Sous UV toute la nuit	<i>E. cloacae</i>

D'après Rutala et Weber (2001), le contact des patients infectés par des bactéries multirésistantes avec des surfaces inertes rend ces dernières contaminées. Le personnel médical, les travailleurs et d'autres patients peuvent être contaminés par contact direct avec ces surfaces qui par la suite, deviendront un réservoir de microorganismes au sein de l'hôpital.

L'acquisition de la résistance peut s'expliquer par l'antibiothérapie que suit le malade et sa durée d'hospitalisation, en particulier au niveau des services de chirurgie, médecine et réanimation où l'utilisation des antibiotiques est inappropriée.

Le tube digestif constitue un important réservoir de bacilles Gram négatifs (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (Donskey, 2006) et la substitution de souche originale par une souche multirésistante se produit généralement pendant l'hospitalisation, en faveur de la sélection de souches résistantes après une antibiothérapie à large spectre ou due à une transmission croisée pendant un séjour dans différentes salles (Biendo et al., 2008).

II-5- PCR du gène *bla*

Le séquençage des produits de l'amplification du gène *bla*, montre la présence de deux types de BLSE (tableau N° XXV).

Tableau N° XXV : Résultats de l'amplification du gène *bla*

Code	Espèces	PCR
707	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
710	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
712	<i>Enterobacter cloacae</i>	SHV-12
714	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15
715	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15
716	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
722	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
730	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
733	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
734	<i>Enterobacter cloacae</i>	SHV-12
737	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
738	<i>Enterobacter cloacae</i>	SHV-12
739	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
745	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15
746	<i>Enterobacter cloacae</i>	SHV-12
762	<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M-15

La majorité des BLSE produites par les souches d'entérobactéries que nous avons isolé de l'environnement hospitalier (*K. pneumoniae* et *E. cloacae*) au niveau de la wilaya de Bejaia sont de type CTX-M-15. Ces dernières semblent avoir une capacité particulière de dissémination (Giraud-Morin et Fosse, 2008). En Algérie, des souches de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* productrices de β -lactamases de type CTX M-15 ont été déjà décrites par Touati et ces collaborateurs sur des prélèvements de surfaces (Touati et al., 2007a) ou de l'air (Touati et al., 2007b) de l'environnement hospitalier.

Ko et al. (2008) ont rapporté dans leur étude que le type CTX-M-15 est plus fréquent que le type SHV-12. Ce constat confirme le résultat que nous avons obtenu puisque seules quatre (04) souches d'*E. cloacae* présentent une β -lactamase de type SHV-12. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Palucha et al. (1999) sur des souches d'*E. coli* productrices de SHV-5/9/12.

Ces résultats montrent une diversité dans la population des souches d'entérobactéries productrices de BLSE constituant cet environnement. En Algérie, aucun cas d'entérobactéries productrices de SHV-12 n'a été rapporté jusqu'à présent dans l'environnement hospitalier. D'autres études concernant les surfaces de l'environnement inanimé ont rapporté la présence de SHV-5 et TEM-1 (Gaillot et al., 1998), CTX-M-15 et SHV-2 (Randrianirina et al., 2009).

Les CTX-M ne sont pas limitées aux infections nosocomiales et leur potentiel de diffusion dans l'environnement hospitalier aggrave la situation (Pitout et Lauplan, 2008). Ce type de propagation dans l'environnement hospitalier est rapide et alarmant malgré l'introduction de procédures visant à limiter la diffusion des bactéries multirésistantes entre les patients (Lavigne et *al.*, 2004).

Chez les souches d'origine clinique, les gènes codant les CTX-M sont souvent localisés sur les plasmides, qui peuvent également transporter des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques, y compris les aminoglycosides, le chloramphénicol, les sulfamides, le triméthoprim et la tétracycline (Bonnet, 2004). La présence des isolats producteurs des BLSE de type CTX-M-15 dans l'environnement hospitalier peut agir en tant que réservoir de gènes de résistance qui peuvent être transmis horizontalement à d'autres isolats (cliniques ou environnementaux) (Touati et *al.*, 2007a).

II-6- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices montrent une variabilité entre les souches et entre leurs réponses aux différents antibiotiques testés. Les valeurs des CMI varient de 8 µg/ml à plus de 128 µg/ml (tableau N° XXVI).

La CMI du céfotaxime est supérieure ($\geq 128\mu\text{g/ml}$) à celle du céftazidime, céfépime, aztréonam et cefpirome chez la majorité des souches, ce constat est une caractéristique des souches productrices de CTX-M (Palucha et *al.*, 1999).

Les souches d'*E. cloacae* semblent être plus résistantes avec des CMI de 128 µg/ml vis-à-vis des quatre antibiotiques testés, c'est le cas des souches 707, 716, 730, 738 et 739. Les résultats obtenus par Biendo et *al.* (2008) ont montré que des souches d'*E. cloacae* BLSE présentent des CMI variables vis-à-vis du CTX et CAZ (8 à plus de 256 µg/ml), 12 à >256 µg/ml pour aztréonam, de 6 à 64 pour céfépime et de 6 à >256 µg/ml pour céfpirome.

Tableau N° XXVI : Concentrations minimales inhibitrices des souches BLSE vis-à-vis des β -lactamines

Types de BLSE	Code	Antibiotiques				
		CTX	CAZ	FEP	ATM	CPO
CTX-M-15	707	>128	>128	128	>128	128
	716	>128	>128	128	128	128
	730	>128	>128	128	128	128
	739	>128	128	>128	128	>128
	737	>128	>128	128	128	8
	745	>128	128	64	128	>128
	714	>128	32	16	32	128
	710	>128	32	128	32	>128
	715	>128	32	64	32	128
	722	>128	32	32	64	128
	733	>128	32	16	64	>128
762	>128	32	64	64	>128	
SHV-12	712	>128	>128	32	>128	64
	734	>128	>128	8	128	128
	738	>128	>128	>128	>128	>128
	746	128	>128	32	>128	16

Toutes les souches CTX-M-15 présentent des CMI ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas de CTX et CPO (à l'exception de la souche 737), 4 souches montrent des CMI de ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ aux antibiotiques testés et 6 souches présentent dans la majorité des cas des CMI allant de 16 à 64 $\mu\text{g/ml}$.

Les souches SHV-12 présentent une CMI de CTX, CAZ et ATM élevée (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) et des CMI faibles dans le cas de FEP (8-32 $\mu\text{g/ml}$) et de CPO (16-64 $\mu\text{g/ml}$). La souche 738 montre des CMI de > 128 $\mu\text{g/ml}$ pour les 4 antibiotiques.

III- Résistance des entérobactéries aux métaux lourds

III-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

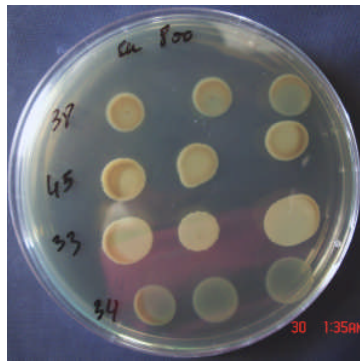
Les 16 souches BLSE ont fait l'objet d'une détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que de l'évaluation de leur résistance vis-à-vis de cinq métaux lourds. Les résultats obtenus montrent que ces souches présentent des CMI variables allant de 40 à 320 µg/ml pour le mercure, de 1600 à 3200 µg/ml pour le cuivre, de 1600 à 4000 µg/ml pour le plomb et de 100 à 400 µg/ml pour le cadmium, par contre toutes les souches sont inhibées à 800 µg/ml de zinc (tableau N° XXVII).

Tableau N° XXVII : Concentrations minimales inhibitrices des souches BLSE vis-à-vis des métaux lourds

Code	Souches	Origines	Hg ⁺²	Cu ⁺²	Zn ⁺²	Pb ⁺²	Cd ⁺²
707	<i>E. cloacae</i>	Amizour	40 ^(*)	2400	800	1600	100
710	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	1600	800	1600	100
712	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	320	1600	800	1600	200
714	<i>K. pneumoniae</i>	Amizour	40	1600	800	1600	100
715	<i>K. pneumoniae</i>	Amizour	40	3200	800	4000	400
716	<i>E. cloacae</i>	Amizour	40	1600	800	1600	100
722	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	3200	800	4000	400
730	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	3200	800	2400	400
733	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	2400	800	2400	200
734	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	160	2400	800	2400	400
737	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	1600	800	2400	200
738	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	320	1600	800	1600	200
739	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	1600	800	1600	200
745	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	2400	800	2400	200
746	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	320	1600	800	2400	200
762	<i>E. cloacae</i>	Khelil Amrane	40	1600	800	2400	400

(*) Les concentrations sont exprimées en µg/ml. **Hg** : Mercure, **Cu** : Cuivre, **Zn** : Zinc, **Pb** : Plomb, **Cd** : Cadmium

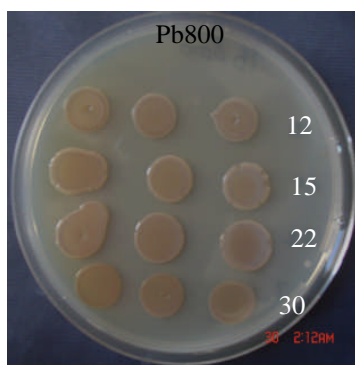
La figure 13 est choisie à titre d'exemple pour montrer la tolérance de quelques souches d'entérobactéries vis-à-vis des différentes concentrations en sels de métaux.



Cuivre



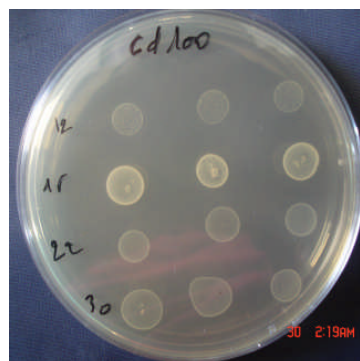
Mercure



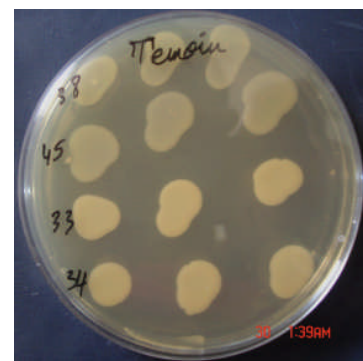
Plomb



Zinc



Cadmium



Temoin

Figure 13 : Concentrations minimales inhibitrices des entérobactéries vis-à-vis des sels de métaux lourds

Dans le cas du mercure, trois quart (75%) des souches testées sont inhibées à une concentration de 40 µg/ml. Ce taux reste inférieur à celui trouvé par Sabry et *al.*, (1997) qui est de 91%, obtenu à une concentration de 20,06 µg/ml en mercure dans le cas de souches isolées des eaux marines. Il y lieu de signaler également que 100% des souches sont inhibées à une concentration en Hg⁺² de 320 µg/ml (figure 14).

Un taux de résistance au mercure de 58,6% a été observé par Nakahara et *al.* (1977) chez des souches d'*E.coli* d'origine clinique.

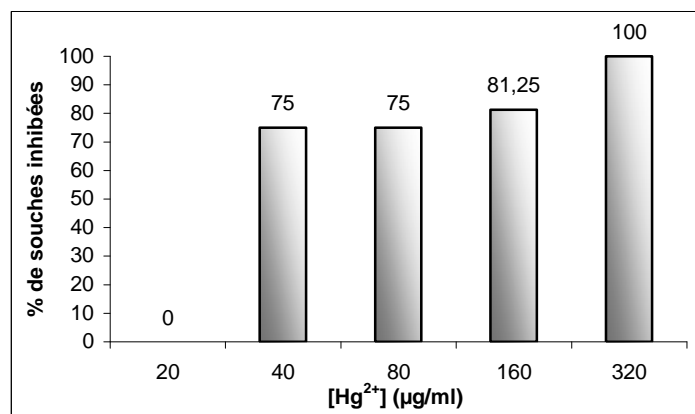


Figure 14 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le chlorure de mercure

Les concentrations minimales inhibitrices du cuivre vis-à-vis des souches d'entérobactéries BLSE (figure 15) sont comprises entre 1600 et 3200 µg/ml. Seules 3 souches (2 souches d'*Enterobacter cloacae* (722, 730) et 1 souche de *Klebsiella pneumoniae* (715)) présentent une CMI de 3200 µg/ml (tableau N° XXVII).

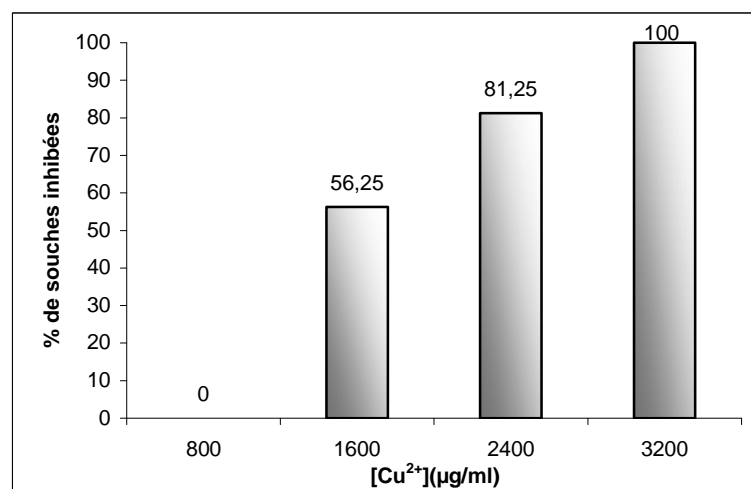


Figure 15 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de cuivre

Dans le cas du zinc toutes les souches (100%) d'entérobactéries étudiées sont inhibées à une concentration de 800 $\mu\text{g/ml}$ (figure 16). On remarque que la réponse de ces souches au zinc est identique quelque soit la souche ainsi que son origine d'isolement.

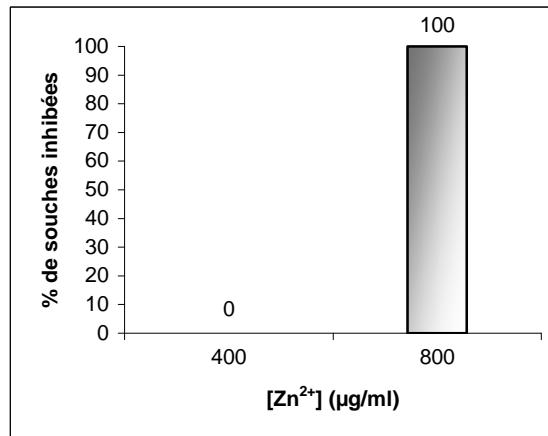


Figure 16 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de zinc

L'étude de l'effet de l'acétate de plomb sur la croissance des différentes espèces d'entérobactéries testées montre que leur réponse varie en fonction des genres, des espèces ainsi que leur origine d'isolement. En effet, la souche 715 (*K. pneumoniae*) isolée de l'hôpital d'Amizour présente une CMI de 4000 $\mu\text{g/ml}$ alors que la souche 714 correspondant à la même espèce présente une CMI de 1600 $\mu\text{g/ml}$. Cette dernière présente la même CMI que la souche 707 qui correspond à *E. cloacae* isolée au sein du même hôpital (tableau N° XXVII). On constate également que les souches d'*E. cloacae* isolées des surfaces des différents services de l'hôpital Khelil Amrane présentent des réponses variables à l'acétate de plomb, leurs CMI varient de 1600 $\mu\text{g/ml}$ (souche 710) à 4000 $\mu\text{g/ml}$ (souche 722).

La figure 17 représente les pourcentages d'inhibition des souches d'entérobactéries par le plomb. On remarque que plus de la moitié des souches (56,25%) sont inhibées à 1600 $\mu\text{g/ml}$, alors que seulement 43,75% des souches présentent une CMI de 2400 $\mu\text{g/ml}$. Sur l'ensemble des souches étudiées, 12,50% présentent une CMI très élevée, qui est de 4000 $\mu\text{g/ml}$.

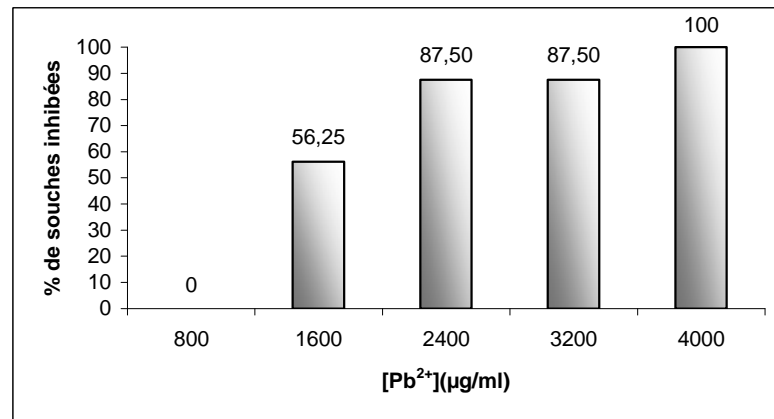


Figure 17 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par l'acétate de plomb

Les souches d'entérobactéries présentent des concentrations minimales inhibitrices variables pour le sulfate de cadmium. A une concentration de 100 µg/ml, seules 25% des souches sont inhibées par contre, à une concentration de 200 µg/ml ce taux d'inhibition passe à 68,75%. Seules 31,25% des souches dont quatre *E. cloacae* et une *K. pneumoniae* présentent une CMI de 400µg/ml (figure 18).

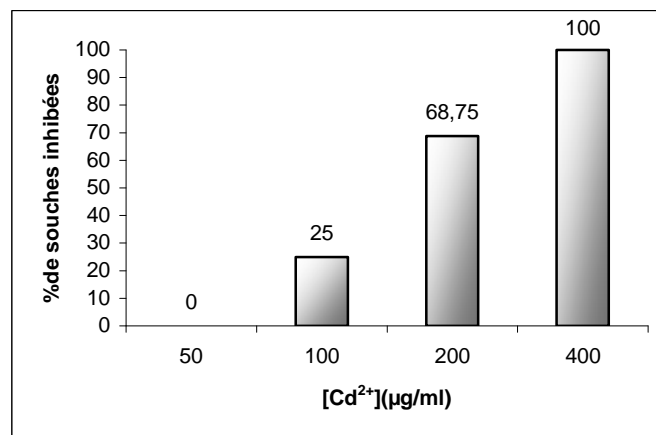


Figure 18 : Taux d'inhibition des souches d'entérobactéries par le sulfate de cadmium

Les résultats obtenus montrent que les souches isolées de l'environnement hospitalier sont plus tolérantes que celles isolées par Sabry et *al.*, (1997) dans des eaux marines. Ceux-ci ont obtenu des taux d'inhibition de 100% avec 158,75 µg/ml en cuivre, 28,1 µg/ml en cadmium, 2072 µg/ml en plomb et 327 µg/ml dans le cas du zinc.

Dans le cas du mercure, les souches de *K. pneumoniae* présentent une CMI de 40 µg/ml tandis que, les souches d'*E. cloacae* présentent des CMI de 40, 160 et 320 µg/ml. Comparativement aux travaux de Karbasizaed et al. (2003) sur les entérobactéries isolées des infections nosocomiales dont la CMI retrouvée est de 54,3 µg/ml, 75% des souches que nous avons isolées présentent une CMI inférieure (40 µg/ml).

Filali et al. (2000) ont observé chez *K. pneumoniae* isolée des eaux usées des CMI de 240,72 et 449,6 µg/ml avec le mercure et le cadmium, supérieures à celles que nous avons obtenues, alors que dans le cas du zinc (130,8 µg/ml) et du cuivre (381 µg/ml), les souches de *K. pneumoniae* que nous avons isolées de l'environnement hospitalier présentent des CMI largement supérieures.

Les souches étudiées présentent des CMI variables vis-à-vis du cuivre (1600, 2400 et 3200 µg/ml, du plomb (1600, 2400, 4000 µg/ml) et du cadmium (100, 200, 400 µg/ml). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Karbasizaed et al. (2003) chez les entérobactéries isolées des infections nosocomiales. Des CMI de 1750µg/ml, 3200µg/ml et 200 µg/ml sont observées respectivement avec le cuivre, le plomb et le cadmium.

Pour le zinc, toutes les souches BLSE présentent la même concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est de 800µg/ml. Calomeris et al. (1984) ont observé une CMI plus élevée de 1600 µg/ml vis-à-vis du zinc chez les bactéries à Gram négatif isolées des eaux de distribution.

III-2- Phénotypes de résistance aux métaux lourds

Les souches d'entérobactéries isolées des différents hôpitaux de la wilaya de Bejaia sont qualifiées de résistantes (R) ou de sensibles (S) (tableau N° XXVIII), en se référant aux travaux de Dhakephalkar et Chopade (1994) (voir matériel et méthodes tableau N° XII).

Tableau N° XXVIII : Résistance des souches BLSE aux métaux lourds

Code	Souches	Hg ⁺²	Cu ⁺²	Zn ⁺²	Pb ⁺²	Cd ⁺²
707	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
710	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
712	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	S	S
714	<i>K. pneumoniae</i>	S	R	S	S	S
715	<i>K. pneumoniae</i>	S	R	S	R	R
716	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
722	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	R	R
730	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	R
733	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
734	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	S	R
737	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
738	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	S	S
739	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
745	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	S
746	<i>E. cloacae</i>	R	R	S	S	S
762	<i>E. cloacae</i>	S	R	S	S	R

Le tableau N° XXVIII montre une tendance générale à la sensibilité des souches d'entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier aux métaux lourds, toutes les souches sont sensibles au zinc par contre elles sont toutes résistantes au cuivre. Seules 2 souches (715 et 722) sont résistantes au plomb, 4 (25%) au mercure et 5 (31,25%) au cadmium (figure 19).

La résistance diffère entre les deux souches de *K. pneumoniae* isolées du même hôpital. La souche 715 présente une résistance au cuivre, au plomb et au cadmium, tandis que la souche 714 n'est résistante qu'au cuivre.

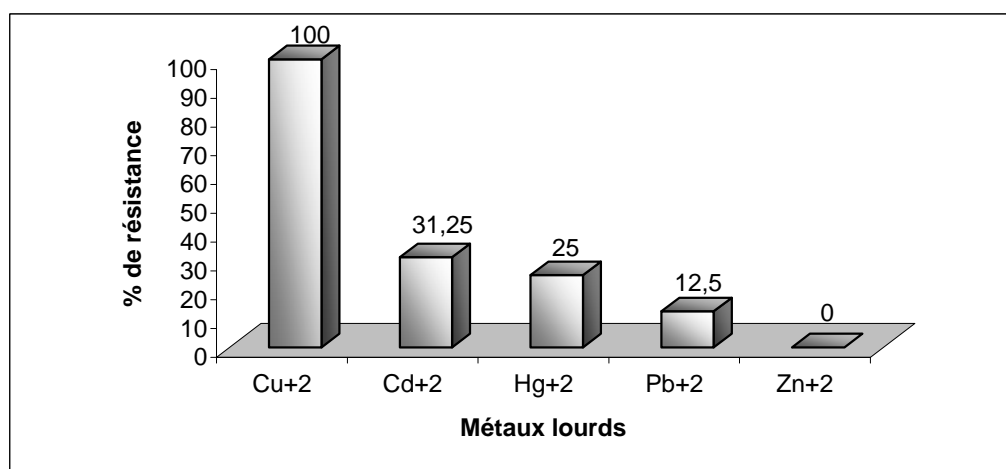


Figure 19 : Taux de résistance des souches BLSE vis-à-vis des métaux lourds

Les taux de résistance des entérobactéries isolées des surfaces de l'environnement hospitalier (figure 19) au mercure (25 %), plomb (12,5 %) et zinc (0%) sont inférieurs à ceux des souches isolées des eaux de mer par Sabry et *al.*, (1997) et qui sont de 53,09 % pour le mercure, 98,76 % pour le plomb et 29,63 % pour le zinc. Les taux de résistance obtenus dans le cas du cadmium (31,25 %) et du cuivre (100 %) sont supérieurs à ceux trouvés par ce même auteur (9,88 % et 77,78 % respectivement).

III-2-1- Métallotypes des entérobactéries productrices de BLSE

En se basant sur la résistance aux métaux lourds, on distingue 05 différents métallotypes (tableau N° XXIX). Le métallotype le plus représentatif est celui du cuivre seul, avec un taux de 50% suivi par la double résistance au cuivre et au mercure (18,75%). On constate également la présence de deux métallotypes correspondant à une triple résistance vis-à-vis de Hg^{2+} - Cu^{2+} - Cd^{2+} et de Cu^{+2} - Pb^{+2} - Cd^{+2} avec des taux de 6,25% et 12,5% respectivement.

Tableau N° XXIX : Métallotypes de résistance des souches BLSE

Type de résistance	Nombre de souches	% de résistance
<u>Résistance à un seul métal</u>		
Cu^{+2}	8	50%
<u>Résistance à deux métaux</u>		
$Hg^{+2} Cu^{+2}$	3	18,75%
$Cu^{+2} Cd^{+2}$	2	12,5%
<u>Résistance à trois métaux</u>		
$Hg^{+2} Cu^{+2} Cd^{+2}$	1	6,25%
$Cu^{+2} Pb^{+2} Cd^{+2}$	2	12,5%

La distribution des métallotypes en fonction des souches appartenant aux deux espèces identifiées montre une diversité dans leur réponse aux métaux lourds. En effet, on remarque que l'une des souches de *K. pneumoniae* présente une seule résistance au cuivre alors que l'autre présente une résistance multiple vis-à-vis de trois métaux à savoir le mercure, le cuivre et le plomb.

Les souches appartenant à l'espèce *E. cloacae* isolée des surfaces des deux hôpitaux (Amizour et Khelil Amrane) sont réparties dans les cinq métallotypes présentés dans le tableau N° XXIX.

III-3- Corésistance des BLSE aux antibiotiques et aux métaux lourds

L'analyse des phénotypes de résistance montre que les différentes souches BLSE présentent une résistance multiple vis-à-vis d'au moins 04 autres antibiotiques (tableau N° XXX).

En comparant les phénotypes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, nous constatons la présence d'une association entre la résistance au cuivre et la résistance aux aminosides, aux β-lactamines, à la rifampicine et aux sulfamides chez toutes les souches à l'exception des deux souches de *K. pneumoniae* qui sont sensibles aux sulfamides. Une corrélation positive entre la tolérance à des concentrations élevées en cuivre, plomb et zinc et la multirésistance aux antibiotiques a été signalée par Calomiris et al. (1984) et Karbasizaed et al. (2003).

De nombreux chercheurs ont signalé que les souches de l'environnement résistantes aux métaux lourds sont également résistantes à une large gamme d'antibiotiques et qu'il existe une corrélation entre la résistance aux métaux lourds et la résistance aux antibiotiques (Bezverbnaya et al., 2005 ; Pal et al., 2004 ; Hassen et al., 1998 ; Sabry et al., 1997).

Tableau N° XXX : Phénotypes de résistance des BLSE aux antibiotiques et aux métaux lourds

Code	Espèces	Métaux	Antibiotiques
707	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, OFX, β-lactamines
710	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, β-lactamines
712	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, β-lactamines
714	<i>K. pneumoniae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, RIF, β-lactamines
715	<i>K. pneumoniae</i>	Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺	GM, TOB, KAN, RIF, β-lactamines
716	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, AMK, SXT, RIF, β-lactamines
722	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, OFX, β-lactamines
730	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Cd ²⁺	GM, TOB, KAN, AMK, SXT, RIF, β-lactamines
733	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, OFX, β-lactamines
734	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, β-lactamines
737	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, AMK, RIF, β-lactamines
738	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	GM, TOB, SXT, RIF, C, OFX, β-lactamines
739	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, OFX, β-lactamines
745	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, OFX, β-lactamines
746	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, β-lactamines
762	<i>E. cloacae</i>	Cu ²⁺ , Cd ²⁺	GM, TOB, KAN, SXT, RIF, C, TET, NOR, CIP, β-lactamines

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries est plus fréquemment associée et corrélée avec la résistance aux métaux (Baker-Austin et al., 2006). Le regroupement des gènes en cluster sur le même plasmide favorise le transfert de ces gènes en même temps en cas de conjugaison. Ainsi, dans un environnement avec des contraintes multiples, par exemple les antibiotiques et les métaux lourds, les bactéries avec des gènes de résistance organisés en clusters sont plus susceptibles de transmettre simultanément ces gènes aux autres bactéries et ces bactéries auraient alors une meilleure chance de survie. Dans une telle situation, on peut suggérer une association entre la résistance aux antibiotiques et la tolérance aux métaux lourds (Spain et Alm, 2003) (tableau N° XXXI).

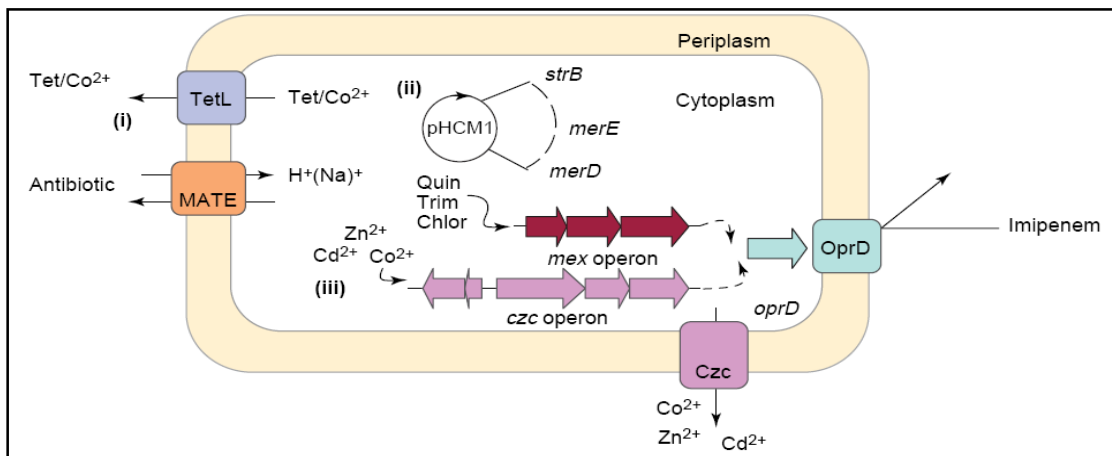
Tableau N° XXXI : Mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (Baker-Austin et al., 2006).

Mécanismes de résistance	Les ions métalliques	Les antibiotiques
Réduction de la perméabilité	As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag	Ciprofloxacine, Tétracycline, Chloramphénicol, β -lactames
Altération du métal et de l'antibiotique	As, Hg	β -lactames, Chloramphénicol
Système d'efflux	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tétracycline, Chloramphénicol, β -lactames
Altération (inactivation et modification) de la cible cellulaire	Hg, Zn, Cu	Ciprofloxacine, β -lactames, Triméthoprim, Rifampicine
Séquestration	Zn, Cd, Cu	Coumermycine A

La co-résistance se produit quand les gènes spécifiques d'un phénotype de résistance sont localisés sur le même support génétique tel que le plasmide, le transposon ou l'intégron (Chapman, 2003). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux métaux et aux antibiotiques sont :

- (i) la co-résistance, par laquelle un seul système biochimique puisse conférer une résistance aux antibiotiques et aux métaux, c'est le cas de la protéine TetL qui peut transporter la tétracycline et le cobalt (figure 20).
- (ii) la co-résistance associée aux déterminants de la résistance : la résistance à un composé donné est la conséquence de la résistance à d'autres composés toxiques, ce cas de la liaison entre la résistance à la streptomycine avec les gènes de résistance au mercure sur le plasmide pHCM1 (figure 20).
- (iii) la résistance par la co-régulation, par laquelle divers systèmes de régulation sont transcriptionnellement liés, ainsi, l'exposition à un composé toxique peut mener à la résistance à un autre composé. C'est le cas de la liaison entre les opérons *mex* et *czc*

qui mènent à l'expression de l'efflux du métal et de la résistance à l'imipenème (figure 20) (Baker-Austin et al., 2006).



Chlor : chloramphénicol ; MATE : multidrug and toxic compound extrusion ; merD : gène codant la protéine de régulation de l'opéron mer ; merE : gène codant la protéine d'efflux du mercure ; pHCM1 : plasmide de résistance de *Salmonella typhi* CT18 ; Quin : quinolone ; strB : gène codant l'enzyme qui assure la modification de la streptomycine ; Tet : tétracycline ; TetL : protéine de flux de la tétracycline ; Trim : triméthoprim.

Figure 20 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la cosélection de la résistance aux métaux et aux antibiotiques (Baker-Austin et al., 2006).

Plusieurs travaux ont rapporté la présence de microorganismes résistants aux antibiotiques et aux métaux lourds dans des infections nosocomiales (Karbasizaed et al., 2003) et dans divers environnements contaminés par des métaux telles que les eaux usées (Abskharon et al., 2008), le sol (Pal et al., 2004) et les sédiments (Altug et Balkis, 2009). Deshpande et al., (1993) ont rapporté une corrélation entre la résistance aux métaux (vis-à-vis du mercure et du cadmium) et la production d'une β -lactamase chez les staphylocoques, *Brahmella* et chez *Acinetobacter* d'origine clinique.

IV-Transfert de gènes de résistance par conjugaison

Le transfert de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds par conjugaison des souches d'entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier a été effectué pour quatre souches d'entérobactéries productrices de BLSE représentées dans le tableau N° XXXII.

Tableau N° XXXII : Choix des souches pour l'étude du transfert des gènes de résistance

Code	Origines	Services	Espèces	Résistance	
				RIF	AMX
714	Amizour	Médecine homme	<i>K. pneumoniae</i>	I	R
707	Amizour	Chirurgie femme	<i>E. cloacae</i>	I	R
739	Khelil Amrane	Réanimation	<i>E. cloacae</i>	I	R
745	Khelil Amrane	Chirurgie orthopédique femme	<i>E. cloacae</i>	I	R

Aucune croissance n'a été observée sur la gélose de sélection dans le cas des souches 714 (*K. pneumoniae*), 707 (*E. cloacae*) et 745 (*E. cloacae*) donc, le transfert de la résistance aux antibiotiques n'a pas eu lieu. Des résultats similaires ont été rapportés par Touati et *al.* (2006) pour deux souches de *K. pneumoniae*.

Des transconjugants de la souche 739 (*E. cloacae*) ont été obtenus sur la gélose de sélection ce qui confirme le transfert des gènes de résistance *bla_{CTX-M-15}* aux antibiotiques. Les colonies obtenues sur les boîtes contenant les transconjugants issus de cette souche, repiquées dans un bouillon nutritif contenant un disque d'amoxicilline (30 µg/ml) ont donné un trouble après 24h d'incubation à 37°C. Après repiquage sur le milieu de sélection, seule une boîte (TC P-739) présente une croissance (figure 21).

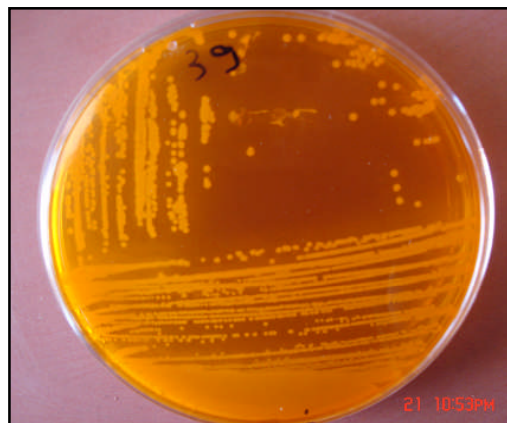


Figure 21 : Croissance du transconjugant P-739

L'absence de la croissance sur la gélose de sélection dans le cas des autres colonies pourrait être due à l'instabilité du matériel génétique acquis.

Les résultats de l'antibiogramme réalisé vis-à-vis du transconjugant (TC P-739) et du témoin (*Proteus mirabilis*) sont résumés dans le tableau N° XXXIII.

Tableau N° XXXIII : Diamètres des zones d'inhibition obtenus pour le transconjugant P-739 vis-à-vis des antibiotiques

Souches	Antibiotique testés									
	CTX		CAZ		FEP		ATM		CPO	
TC P-739	18	R	20	I	26	S	26	I	21	I
<i>Proteus</i> (T)	42	S	32	S	ND	/	45	S	37	S

TC : Tansconjuguant, T : Témoin, R : Résistant, I : Intermédiaire, S : Sensible, ND : Non déterminé

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition du tansconjuguant et du témoin confirme le transfert des gènes de résistance puisque *Proteus* auparavant sensible aux antibiotiques testés (figure 22) est devenu résistant au céfotaxime (CTX) et intermédiaire aux céftazidime (CAZ), aztréonam (ATM) et céfpirome (CPO) après le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.

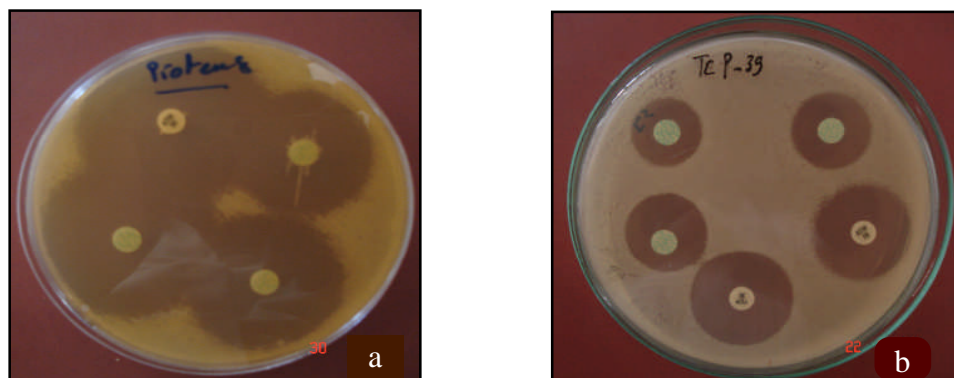


Figure 22 : Antibiogramme de *Proteus mirabilis* avant (a) et après (b) conjugaison

On remarque qu'il y'a une diminution importante des diamètres des zones d'inhibitions par rapport au profil de résistance de la souche réceptrice (*Proteus*) avant la conjugaison. Toutefois, cette récupération ne correspond pas à un transfert total de la résistance comparé au profil de résistance de la souche 739 (donatrice) qui est résistante à tous les antibiotiques testés.

La tolérance de *Proteus mirabilis* aux métaux lourds étudiés ne permet pas la mise en évidence du transfert des gènes codant leur résistance car, cette souche présente un profil de résistance semblable pour certains métaux et elle est plus résistante pour d'autres comparée à la souche 739.

Conclusion

Conclusion

Au cours de cette présente étude qui s'est déroulée au niveau de trois hôpitaux (Amizour, Khelil Amrane et Frantz Fanon) de la wilaya de Bejaia nous avons obtenu les résultats suivants :

- Sur les 428 prélèvements effectués, 62 souches d'entérobactéries sont isolées et identifiées. 38 souches sont isolées de l'hôpital Khelil Amrane, 15 de l'hôpital d'Amizour et 9 de l'hôpital Frantz Fanon.
- 27/62 souches sont isolées à partir des draps de lits de malades, 16/62 des tables, 7 à partir des paillasses des salles de soin et 4/62 de différents matériel médicale (tuyauterie à oxygène, bocal d'aspiration et le cardiogramme).
- 53,23 % des souches d'entérobactéries sont résistantes au céftazidime, 46,77 % sont résistantes au céfotaxime et 46,77 % sont résistantes aux deux molécules.
- 16/33 souches d'entérobactéries (14 *E. cloacae* et 02 *K. pneumoniae*) sont productrices de BLSE. Ces souches sont résistantes à d'autres familles d'antibiotiques à savoir les aminosides, quinolones, sulfamides, rifamycine, tétracycline et chloramphénicol.
- 12 souches (02 *K. pneumoniae* et 10 *E. cloacae*) sont productrices d'une BLSE de type CTX-M-15 et 04 souches d'*E. cloacae* une BLSE de type SHV-12.
- La CMI du céfotaxime ($\geq 128 \mu\text{g/ml}$) est supérieure à celle du céftazidime, céfépime, aztréonam et cefpirome chez la majorité des souches.
- Nous constatons la présence d'une association entre la résistance au cuivre et la résistance aux aminosides, aux β -lactamines, à la rifamycine et aux sulfamides chez toutes les souches d'*E. cloacae*.
- Toutes les souches sont sensibles au zinc par contre elles sont toutes résistantes au cuivre. Seules 2 souches sont résistantes au plomb, 4 au mercure et 5 au cadmium.
- Les CMI des souches BLSE sont de 40 à 320 $\mu\text{g/ml}$ pour le mercure, 1600 à 3200 $\mu\text{g/ml}$ pour le cuivre, 1600 à 4000 $\mu\text{g/ml}$ pour le plomb, 100 à 400 $\mu\text{g/ml}$ pour le cadmium et 800 $\mu\text{g/ml}$ pour le zinc.
- Le transfert des gènes *bla*_{CTX-M} par conjugaison n'est obtenu que pour une seule souche d'*E. cloacae* (739).

Bien que les surfaces microbiologiquement contaminées puissent servir de réservoirs pour les microorganismes potentiellement pathogènes, le transfert de ces microorganismes à

partir des surfaces de l'environnement aux patients implique en grande partie le contact des mains avec ces surfaces. L'hygiène des mains est importante pour minimiser l'impact de ce transfert, le nettoyage et la désinfection des surfaces de l'environnement sont indispensables pour la réduction de l'incidence des infections nosocomiales (C.D.C.P. et H.I.C.A.C., 2003).

Cette étude a montré que les entérobactéries sont omniprésentes sur les surfaces inanimées de l'environnement hospitalier. Les BLSE présentent une part non négligeable de cette contamination. Leur présence au niveau des services à haut risque (réanimation et bloc opératoire) dénotent de l'insuffisance et du dysfonctionnement des procédures d'hygiène.

Hormis ces mesures d'hygiène, plusieurs autres actions peuvent être entreprises :

- Sensibilisation de l'ensemble des acteurs des secteurs sanitaires sur la réalité du phénomène de résistance et la transmission des bactéries multirésistantes ;
- L'usage rationnel des antibiotiques pour préserver les quelques molécules encore actives qui constituent les ultimes ressources thérapeutiques ;
- Installation de système de surveillance de la résistance aux antimicrobiens chez les isolats communautaires et nosocomiaux ;
- Etude de la relation entre l'utilisation des antimicrobiens et la résistance dans l'environnement hospitalier ;
- Application des mesures de précaution vis-à-vis des patients suspectés d'être colonisés ou infectés par des microorganismes qui peuvent être transmis par contact direct ou indirect.

Les résultats de cette étude attirent une attention particulière sur le degré de contamination des surfaces inanimées à proximité des patients dans nos hôpitaux.

Ces constatations appuient l'hypothèse que les surfaces puissent servir de réservoirs de microorganismes dont l'identification peut être utile pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes nosocomiaux.

Les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- La détermination de l'évolution de la contamination des surfaces de l'environnement hospitalier dans le temps ;
- L'extension de la zone d'étude et l'augmentation du nombre de prélèvements pour une meilleure prévention de la dissémination ;

- L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale pour inclure les bactéries Gram positives et la flore fongique, afin de déterminer la place des bactéries multirésistantes (BMR) parmi ces germes ;
- L'extension de l'étude sur d'autres composantes de l'environnement interne (air, eau) et externe (effluents) à l'hôpital pour mesurer la capacité d'adaptation de ces entérobactéries BLSE (CTX-M-15) et la possibilité de transferts génétiques ;
- L'étude de l'incrimination des souches BLSE isolées de l'environnement hospitalier dans les infections nosocomiales ;
- L'évaluation de l'efficacité des produits désinfectants et détermination des mécanismes de résistance à ces derniers ;
- L'étude de la résistance aux métaux lourds et recherche des mécanismes impliqués dans la co-résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques dans l'environnement hospitalier.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abbassi M. S., Torres C., Achour W., Vinué L., Sáenz Y., Costa D., Bouchami O., Ben Hassen A. (2008).** Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*. 32 : 308-314.
- Abid F., Boutefnouchet N., Dekhil M. and Bouzerna N. (2007).** *Klebsiella pneumoniae* productrices de Beta-lactamases à spectre Elargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *Scientific Study & Research*. 3 (2) : 199- 214.
- Abskharon R. N. N., Hassan S. H. A., Gad El-Rab S. M. F. and Shoreit A. A. M. (2008).** Heavy Metal Resistant of *E. coli* Isolated from Wastewater Sites in Assiut City, Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol*. 81. 309-315.
- Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). (2005).** Le mercure des amalgames dentaires : Actualisation des connaissances, mise en place d'un réseau d'évaluation pluridisciplinaire, recommandations. 103p.
- Al-Hamad A. and Maxwell S. (2008).** How clean is clean? Proposed methods for hospital cleaning assessment. *J Hosp Infect*. 70 : 328-334.
- Altug G. and Balkis N. (2009).** Levels of some toxic elements and frequency of bacterial heavy metal resistance in sediment and sea water. *Environ Monit Assess*. 149 : 61-69.
- Amir S. (2005).** Contribution à la valorisation des boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. 341p.
- Audurier A., Fenneteau A., Laudat P. and Mereghetti L. (1998).** L'air à l'hôpital. In : Hygiène Hospitalière. Ed. Presses Universitaires de Lyon. Lyon. Pp. 387-399.

B

- Baker-Austin C., Wright M. S., Stepanauskas R. and McArthur J.V. (2006).** Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*. 14 (4) : 176-182.
- Barbut F. and Neyme D. (2006).** Les difficultés d'interprétation des contrôles microbiologiques environnementaux. *Revue Francophone des Laboratoires*. (382). 27-32.
- Barkay T., Miller S. M. and Summers A. O. (2003).** Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 27 : 355-384.
- Benedetto D. (1997).** Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation : les métaux lourds. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. 49p.
- Bertrou A., Chapuis C. and Hajjar J. (2000).** Relations entre contamination et environnement hospitalier. In : Vigilance Environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *Hygiènes*. 8 (3): 142-146.
- Bezverbnaya I. P., Buzoleva L. S. and Khristoforova N. S. (2005).** Metalresistant heterotrophic bacteria in coastal waters of primorye. *Russ J Mar Biol*. 31.73-77.

- Bhalla A., Pultz N. J., Gries D. M., Ray A. J., Eckstein E. C., Aron D. C. and Donskey C. J. (2004).** Acquisition of Nosocomial Pathogens on Hands After Contact With Environmental Surfaces Near Hospitalized Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **25** (2) : 164-167.
- Biendo M., Manoliu C., Laurans G., Castelain S., Canarelli B., Thomas D., Hamdad F., Rousseau F. and François E. (2008).** Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Res Microbiol.* **159** : 590-594.
- Bisson G., Fishman N. O., Patel J. B., Edelstein P. H. and Lautenbach E. (2002).** Extended- spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **23** : 254-60.
- Bloomfield S. F. and Scott E. (1997).** Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *J Appl Microbiol.* **83**: 1-9.
- Bonnet R. (2004).** Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **48** (1) : 11-14.
- Bosi C. (2000).** Analyse Bactériologique de l'Environnement Hospitalier. Précis de Bactériologie Clinique. Ed. ESKA. Paris. 408-437.
- Boyce J. M. (2007).** Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect.* **65** (S2) : 50-54.
- Brown N. L., Camakaris J., Lee B. T.O., Williams T., Morby A. P., Parkhill J. and Rouch D. A. (1991).** Bacterial Resistances to Mercury and Copper. *J Cell Biochem.* **46** : 106-114.
- Bruins M.R., Kapil S. and Oehme F. W. (2000).** Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* **45** : 198-207.

C

- C.D.C.P. and H.I.C.A.C. (Centers for Disease Control and Prevention, Healthcare Infection Control Advisory Committee). (2003).** Guidelines for environmental infection control in healthcare facilities. Available at: <http://www.cdc.gov>.
- Calomiris J. J., Armstrong J. L. and Seidler R. J. (1984).** Association of Metal Tolerance with Multiple Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Drinking Watert. *Appl Environ Microbiol.* **47** (6) : 1238-1242.
- Carling P. C., Parry M. F. and Von Beheren S. M. (2008).** Identifying Opportunities to Enhance Environmental Cleaning in 23 Acute Care Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **29** (1) : 1-7.
- Carpentier B. and Cerf O. (1993).** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* **75** (6) : 499-511.
- Casas S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de Doctorat. Université du sud Toulon Var. France. 314p.

CA-SFM. (2009). (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

- Cavallo J. D., Antoniotti G., Baffo N. Y., Condras G. S., Hajjar J., Horn C., Le Gouhir C., Le Guyader A., Le jeune B., Mounier M. and Salomon V. (2002).** Surveillance Microbiologique de l'Environnement dans les Etablissements de Santé Air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN. France. 70p.
- Chapman, J. S. (2003).** Disinfectant resistance mechanisms, crossresistance and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **51** : 271-276.

D

- D'agata E. M. C., Venkataraman L., Degirolami P. and Samore M. (1999).** Molecular Epidemiology of Ceftazidime-Resistant Gram-Negative Bacilli on Inanimate Surfaces and Their Role in Cross-Transmission during Nonoutbreak Periods. *J Clin Microbiol*. **37** (9) : 3065-3067.
- Dakic I., Morrison D., Vukovic D., Savic B., Shittu A., Hauschild P. J. T., and Stepanovic S. (2005).** Isolation and Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment. *J Clin Microbiol*. **43** (6) : 2782-2785.
- Dancer S. J. (1999).** Mopping up hospital infection. *J Hosp Infect*. **43** : 85-100.
- Dancer S. J. (2004).** How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *J Hosp Infect*. **56** : 10-15.
- Dancer S. J., Coyne M., Robertson C., Thomson A., Guleri A. and Alcock S. (2006).** Antibiotic use is associated with resistance of environmental organisms in a teaching hospital. *J Hosp Infect*. **62** : 200-206.
- Darbord J.C. (1998).** Désinfectants et désinfection. *In* : Hygiène hospitalière. Ed. Presses universitaires de Lyon. Lyon. 197-206.
- Deshpande L. M., Kapadnis B. P. and Chopade B. A. (1993).** Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to β -laetamase production. *BioMetas*. **6** : 55-59.
- De Vicente A., Aviles M., Codin J. C., Borrego J. J. and Romer P. (1990).** Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J Appl Bacteriol*. **68** : 625-432.
- Dhakephalkar P. K. and Chopade B. A. (1994).** High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. *BioMetals*. **7** : 67-74.
- Donskey C. J. (2006).** Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis*. **43** : S62-69.

E

- Emori T. G. and Gaynes R. P. (1993).** An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. **6** (4) : 428-42.

F

- Fabry J. (2000).** Introduction. *In* : Vigilance Environnementale : Contrôles microbiologiques de l'environnement hospitalier. *Hygiènes*. **8** (3): 141.
- Falagas M. E., Karageorgopoulos D. E. (2009).** Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*. 1-10.
- Filali B.K., Taoufik J., Zeroual Y., Dzairi F.Z., Talbi M. and Blaghen M. (2000).** Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics. *Curr Microbiol*. **41** : 151-156.
- Foster T. J. (1983).** Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiol Rev*. **47** (3) : 361-409.
- French G. L., Shannon K. P. and Simmons N. (1996).** Hospital Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Broad-Spectrum Cephalosporins and β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations by Hyperproduction of SHV-5 β -Lactamase. *J Clin Microbiol*. **34** (2) : 358-363.
- French G.L., Otter J.A., Shannon K.P., Adams N.M.T., Watling D. and Parks M.J. (2004).** Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) : a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect*. **57** : 31-37.

G

- Gadd G. M. and Griffiths A. J. (1978).** Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microb Ecol*. **4** : 303-317.
- Gadd G. M. (2009).** Heavy Metal Pollutants : Environmental and Biotechnological Aspects. *In* : Encyclopedia of microbiology. Ed. San Diego State University. USA. 321- 334.
- Gaillot O., Maruejoul C.S., Abachin E., Lecuru F., Arlet G., Simonet M. and BERCHE P. (1998).** Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing SHV-5 Extended-Spectrum β -Lactamase, Originating from a Contaminated Ultrasonography Coupling Gel. *J Clin Microbiol*. **36** (5) : 1357-1360.
- Georgopapadakou N. H. (2008).** Antibiotic Resistance in *Enterobacteria*. *In* : Bacterial Resistance to Antimicrobials. Ed. Taylor & Francis Group. New York. 343-362.
- Giraud-Morin C. and Fosse T. (2008).** Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathol Biol* . **56**: 417-23.
- Girou E. and Fagon J. Y. (1998).** Service de réanimation : impact sur la prévention des infections nosocomiales. *In* : Infections nosocomiales et environnement hospitalier. Ed. Flammarion. Paris. 72-80.

H

- Hassen A., Saidi N., Cherif M. and Boudabous A. (1998).** Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol*. **64**. 7-15.
- Hernandez-Alles S., Vicente J. B., Luis Martinez M., Alvaro P., Aguilar A., Juan M. T. and Alberti. (1999).** Development of Resistance during Antimicrobial Therapy Caused

by Insertion Sequence Interruption of Porin Genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **43** (4) : 937-939.

Hoet T. (1998). Blocs opératoires. *In* : Infection nosocomiales et environnement hospitalier. Ed. Flammarion. Paris. 127- 134.

Hosein I. K., Hill D.W., Jenkins L. E. and Magee J.T. (2002). Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *J Appl Microbiol.* **92**: 90S-97S.

Hota B. (2004). Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization : Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Clin Infect Dis.* **39** : 1182-1189.

I

Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bouguessa N., Lounes S., Bakour R. and Arlet G. (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* **62** : 133-136.

J

Jarlier V., Nicolat M. H., Fournier G. and Philippon A. (1988). Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to new β -lactam agents in *Enterobacteriaceae* : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev infect dis.* **10** : 867-878.

Ji G. and Silver S. (1995). Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* **14** : 61-75.

K

Kac G., Podglajen I., Vaupré S., Colardelle N., Buu-Hoï A. and Gutmann L. (2004). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **25** (10) : 852-855.

Kalantari N. (2008). Evaluation of Toxicity of Iron, Chromium and Cadmium on *Bacillus cereus* Growth. *Iran J Basic Med Sci.* **10** (4) : 222- 228.

Karbasizaed V., Badami N. and Emtiazi G. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Afr J Biotechnol.* **2** (10) : 379-383.

Ko K.S., Lee M.Y., Song J.H., Lee H., Jung D.S., Jung S.I., Kim S.W., Chang H.H., Yeom J.S., Kim Y.S., Ki H.K., Chung D.R., Kwon K.T., Peck K.R. and Lee N.Y. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **61** : 453-459.

Kramer A., Schwebke I. and Kampf G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? *BMC Infect Dis.* **6** : 130-138.

L

- Laveran H. (1998).** L'infection nosocomiale. *In* : Hygiène Hospitalière. Presses universitaires de Lyon. Lyon. 35-42.
- Lavigne J.P., Bouziges N., Chana C., Mahamat A., Michaux-Charachon S. and Sotto A. (2004).** Molecular Epidemiology of *Enterobacteriaceae* Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in a French Hospital. *J Clin Microbiol*, Aug. **42** (8) : 3805–3808.
- Le Heurt M., Gomila H., Guirot S. and Rafaoni M. J. (1995).** Hygiène. *In*. Nouveau Cahier de l'Infirmière. Ed. Masson. Paris. **5** : 158p.
- Le Minor C. and Richard C. (1993).** Notes techniques. *In* : Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Ed. Institut Pasteur. Paris. 217p.
- Levent T., Gauthier M., Dezorzi S., Paradis P., Alibert J., Bettoni C. and Stock B. (2005).** L'hygiène hospitalière et le conseil en antibiothérapie : un duo opérationnel face au problème de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Med Mal Infect.* **35** : 443-449.
- Liassine N. (2000).** Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr.* **130** : 1930-6.
- Lockhart S. R., Abramson M. A., Beekmann S. E., Gallagher G., Riedel S., Diekema D. J., Quinn J. P. and Doern G. V. (2007).** Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol.* **45** (10) : 3352–3359.
- Lucet J. C. and Astagneau P. (1998).** Transmission des infections nosocomiales. Principe et prévention. *In* : Infection nosocomiales et environnement hospitalier. Ed. Flammarion. Paris. 7- 10.

M

- Mereghetti L. (1998).** Surveillance et contrôle de l'environnement hospitalier. *In*. Hygiène Hospitalière. Ed. Presses universitaires de Lyon. Lyon. 337-346.
- Mindlin S. Z., Bass I. A., Bogdanova E. S., Gorlenko Z. M., Kalyaeva E. S., Petrova M. A. and Nikiforov V. G. (2002).** Horizontal Transfer of Mercury Resistance Genes in Environmental Bacterial Populations. *Mol Biol.* **36** (2) : 160-170.
- Mirouze M. (2005).** Recherche de gènes impliqués dans la tolérance au zinc chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc *Arabidopsis halleri* : un nouveau rôle possible pour les défensines de plantes. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II. 184p.
- Monchy S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles. 99p.
- Mota P. Q. F. and Edberg S. C. (2002).** Nosocomial Infections. *In* : Encyclopedia of Environmental Microbiology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 2235-2250.
- Murata K., Fukuda Y., Shimosaka M., Wantanabe K., Saikusa T. and Kimura A. (1985).** Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1200-1207.

N

- Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y., Kondo I., Kozokue H. and Silver S . (1977).** Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **33** : 975-976.
- Nascimento A. M. A. and Chartone-Souza E. (2003).** Operon mer : bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet. Mol. Res.* **2**: 92-101.
- Neely A. N. (2000).** A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J Burn Care Rehabil.* **21** : 523-527.
- Neely A. N., Maley M. P. (2000).** Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabric and plastic. *J Clin Microbiol.* **38** : 724-726.
- Nies D. H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51** : 730-750.

O

- Owens R. C. and Rice L. (2006).** Hospital-Based Strategies for Combating Resistance. *Clin Infect Dis.* **42 (S4)** : 173-181.

P

- Pal A. and Paul A. K. (2008).** Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol.* **48** : 49-64.
- Pal A., Choudhuri P., Dutta S., Mukherjee P. K. and Paul A. K. (2004).** Isolation and characterization of nickel-resistant microflora from serpentine soils of Andaman. *World J Microbiol Biotechnol.* **20** : 881-886.
- Palucha A., Mikiewicz B. and Gniadkowski M. (1999).** Diversification of *Escherichia coli* Expressing an SHV-Type Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) during a Hospital Outbreak: Emergence of an ESBL-Hyperproducing Strain Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **43 (2)** : 393-396.
- Pérez J. L., Gómez E. and Sauca G. (1990).** Survival of gonococci from urethral discharge on fomites. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **1** : 54-55.
- Pitout J. D. and Laupland K. B. (2008).** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* : an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **8** : 159-66.
- Poole K. (2004).** Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* **61** : 2200–2223.
- Prüss A., Giroult E. and Rushbrook P. (1999).** Hospital hygiene and infection control. *In* : Safe management of wastes from health-care activities. Ed. World Health Organization. Geneve. 148-158.

R

- Rampling A., Wiseman S., Davis L., Hyett A. P., Walbridge A. N., Payne G. C. and Cornaby A. J. (2001).** Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* **49** : 109-116.
- Randrianirina F., Vedy S., Rakotovao D., Ramarokoto C.E., Ratsitohaina H., Carod J.F., Ratsima E., Morillon M. and Talarmin A. (2009).** Role of contaminated aspiration

tubes in nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-2 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases. *J Hosp Infect.* **72** : 23-29.

- Rodriguez-Villalobos H. and Struelens M.-J. (2006).** Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implication pour le réanimateur. *Réanimation.* **15** : 205-213.
- Rouch D. A., Lee B. T.O. and Morby A. P. (1995).** Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol.* **14** : 132-141.
- Rouillon S., Ourdanabia S., Jamart S., Hernandez C. and Meunier O. (2006).** Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathol Biol.* **54** : 325-330.
- Russell A. D. (1998).** Bacterial resistance to disinfectants : present knowledge and future problems. *J Hosp Infect.* **43** : S57-S68.
- Rutala W. A. and Weber D. J. (1999).** Infection control : the role of disinfection and sterilization. *J Hosp Infect.* **43** : S43-S55.
- Rutala W.A. and Weber D. J. (2001).** Surface disinfection : should we do it? *J Hosp Infect.* **48** : S64-S68.

S

- Sabry S. A., Ghozlan H. A. and Abou-Zeid D. M. (1997).** Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol.* **82** : 245-252.
- Saïdani M., Boutiba I., Ghozzi R., Kammoun A. and Ben Redjeb S. (2006).** Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Med Mal Infect.* **36** : 163-16
- Santo C. E., Taudte N., Nies D. H. and Grass G. (2008).** Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces. *Appl Environ Microbiol.* **74** (4) : 977-986.
- Shlaes D. M., Gerding D. N., John J., Craig F. Jr. W A., Bornstein D. L., Duncan R. A., Eckman M. R., Farrer W. E., Greene W. H., Lorian V., Levy S., McGowan J. E., Paul S. M., Ruskin J., Tenover F.C. and Watanakunakorn Ch. (1997).** Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in Hospitals. *Clin Infect Dis.* **25** : 584-99.
- Silver S. and Phung T. (1996).** Bacterial Heavy Metal Resistance : New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50** : 753-89.
- Spain A. and Alm E. (2003).** Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research.* **2** : 1-6.
- Stout J. E. and Yu V. L. (1997).** Legionellosis. *N Engl J Med.* **337** (10) : 682-7.

T

- Tchounwou P. B., Ayensu W. K., Ninashvili N. and Sutton D. (2003).** Environmental Exposure to Mercury and Its Toxicopathologic Implications for Public Health. *Environ Toxicol.* **18** : 149-175.
- Touati A. (2006).** Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines isolées en milieu hospitalier ; cas de deux hôpitaux de la wilaya de Béjaia. Thèse de doctorat. Université A. MIRA de Béjaia. 86p.
- Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. and De Champs C. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* **27** : 397-402.
- Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Madoux J., Gharout A. and De Champs C. (2007a).** *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J Hosp Infect.* 183-185.
- Touati A., Benallaoua S., Djoudi F., Madoux J., Brasme L. and De Champs C. (2007b).** Characterization of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Hospital Environments in Algeria. *Microb Drug Resist.* **13** (2) : 85-89.
- Touati A., Lucien B., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J., De Champs C. (2008).** First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **60** : 287-290.
- Trajanovska S., Britz M. L. and Bhave M. (1997).** Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation.* **8** : 113-124.

W

- Weaver L., Michels H. T. and Keevil C. W. (2008).** Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel : futuristic options for hospital hygiene. *J Hosp Infect.* **68** : 145-151.
- Webb G. F., D'Agata E. M. C., Magal P. and Ruan S. (2005).** A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *Proc Natl Acad Sci.* **102** (37) : 13343-13348.
- Webster C., Towner K. J. and Humphreys H. (2000).** Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **21** : 246.
- Wendt C., Dietze B., Dietz E. and Rüdén H. (1997).** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol.* **35** : 1394-1397.
- Wheeldon L. J., Worthington T., Lambert P. A., Hilton A. C., Lowden C. J. and Elliott T. S. J. (2008).** Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile* : the germination theory. *J Antimicrob Chemother.* **62** : 522-525.
- Wright G. D. (2008).** Mechanisms of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. *In* : Bacterial Resistance to Antimicrobials. Ed. Taylor & Francis Group. New York. 71-101.

Z

Zeana C., Larson E., Sahni J., Bayuga S. J., Wu F. and Della-Latta P. (2003). The Epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* : Does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol.* **24** (4) : 275-279.

Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée)

(Le Minor et Richard, 1993)

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine	17 g
Peptone de viande	03 g
Lactose	10 g
Mélange de sels biliaires	01,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Chlorure de sodium	05 g
Cristal violet	0,001 g
Agar	10 g
	pH 7,4

Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysât de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
	pH 7,4

Bouillon nutritif

Macération de viande	10 g
Peptone trypsique	05 g
NaCl ou KCl	05 g
	pH 7,3

Milieu Uriselect4 (Bio-RAD)

Base nutritive contenant 4 peptones
 2 substrats chromogènes : β -galactosidase et β -glucosidase
 Tryptophane

Annexe 02 : Protocole d'extraction et d'amplification du gène *bla*

1- Extraction de l'ADN total

La technique utilisée est le choc thermique.

- Quelques colonies fraîchement cultivées sur milieu solide ont été resuspendues dans 300 µl d'eau distillée.
- Chauffer à 100°C/10 min au bain-marie sec.
- Centrifuger à 13000 g pendant 5 minutes.
- Récupérer le surnageant et conserver à -20°C.

2- PCR du gène *bla*

2-1- Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel contient :

- 762.5 µl d'eau distillée
 - 75 µl de tampon TE (tris 10mM+ EDTA 1mM)
 - 7.5 µl de dNTP
- {
- 30 µl de l'amorce CTXM-879-R (5'-CTATTACAAACCGTCGGTGA-3')
 - 30 µl de l'amorce CTXM-405-R (5'-GTGGCGATGAATAAGCTGA -3')
 - 30 µl de l'amorce CTXM-10-F (5'-AAGGAATCCCATGGTTAA -3')
 - 30 µl de l'amorce CTXM-628-R (5'-CCTTTCATCCATGTCACCA -3')
- ou
- {
- 30 µl de l'amorce SHV-1-F (5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG -3')
 - 30 µl de l'amorce SHV-861-R (5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA -3')

- Agiter au vortex
- Ajouter 0.5 µl de *taq* polymérase
- Ajouter 2.5 µl d'extrait d'ADN
- Un témoin positif (2.5 µl d'extrait d'ADN de CTX-M-15) et un témoin négatif (2.5 µl d'eau ayant servie pour la manipulation) ont été également réalisés.

2-2- Amplification du gène *bla*

L'amplification a été réalisée avec la programme suivant :

- Préchauffage à 95°C pendant 5min
- 30 cycles :
 - Dénaturation 94°C pendant 30s ;
 - Appariement 51°C pendant 30s
 - Elongation 72°C pour 30s,
- Elongation finale de 72°C pour 5 min.

Les produits d'amplification sont récupérés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. (le marqueur de poids moléculaire pour la PCR CTX-M étant de 100 pb).

2-3- Electrophorèse en gel d'agarose

• Matériel

- Une cuve pour gel immergé + Support de gel + Peigne (VWR international).
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X (EurobioFrance).
- Solution de bromure d'éthidium (Sigma Aldrich).
- Solution de dépôt : bleu de bromophénol (EurobioFrance).
- Agarose (Invitrogen).
- Four à micro-onde.
- Marqueur de poids moléculaire (fragment de 100 pb et 1Kb) (EurobioFrance).
- Chambre de visualisation Bio-Profil (Vilbert Lourmat).

• Protocole

La technique présentée utilisée est celle des gels immergés : le gel, horizontal, est immergé dans le tampon d'électrophorèse. Ceci permet d'avoir un contact gel-tampon toujours correct.

Le tampon utilisé est le Tris-Borate-EDTA (TBE). L'avantage de ce tampon par rapport au tampon acétate par exemple, est qu'il n'est pas électrolysé et donc réutilisable à plusieurs reprises. De plus il permet d'obtenir d'assez grandes différences de potentiel pour un ampérage qui reste faible (25 mA à 150 V) ce qui évite un échauffement nuisible à la qualité de l'électrophorèse.

- **Préparation des gels**

- Deux gels ont été préparés : l'un à 2% et l'autre à 1.2%.
- On pèse respectivement 2.4 g (gel à 2%) et 1.44 g (gel à 1.2%) d'agarose dans 2 béchers de 250 ml.
- On ajoute 12 ml de tampon TBE 10X (10 fois concentré) et on complète avec 108 ml d'eau distillée.
- On fait fondre le mélange au four à micro-ondes en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent. On laisse refroidir.
- On ajoute 6 µl de solution de bromure d'éthidium et on homogénéise.
- On coule le gel dans le support du gel sans faire de bulles et on place les peignes. On laisse refroidir.

- **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Lorsque le gel est polymérisé (environ 20 min), on retire délicatement les peignes et les adhésifs.
- On met le gel dans la cuve d'électrophorèse avec le support.
- On remplit la cuve avec le tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm de tampon.
- 10 µl de produits d'amplification sont mélangés avec 3 µl de « solution de dépôt » qui contient du bromophénol.
- On dépose à l'aide d'une micropipette 10 µl de ce mélange.
- Un puits recevra le produit de l'amplification du témoin positif, un autre celui du témoin négatif et un autre le marqueur de poids moléculaire (fragment de 100 pb pour la PCR CTX-M).
- On branche le générateur et on applique une ddp de 150 V. La durée de migration est d'environ 30 min.

- **Visualisation**

Lorsque la migration est suffisante (environ 30 min), on arrête le générateur, on ôte le support contenant le gel de la cuve et on le place dans une chambre de visualisation. Les bandes d'ADN sont fluorescentes grâce au bromure d'éthidium et une photo du gel est prise.

Annexe 03 : Préparation des concentrations en sels de métaux lourds

Mercure : La concentration de la solution mère est de 10mg/ml

[Hg ²⁺]	[HgCl ₂] µg	VSM (ml)	VMH (ml)
2,5	3,385	0,047	139,953
5	6,770	0,095	139,905
10	13,539	0,190	139,810
20	27,078	0,379	139,621
40	54,157	0,758	139,242
80	108,313	1,516	138,484
160	216,626	3,033	136,967
320	433,252	6,066	133,934

Cuivre : La concentration de la solution mère est de 0,5g/ml

[Cu ⁺²]	[CuSO ₄ , 5H ₂ O]	VSM (ml)	VMH (ml)
100	393,082	0,110	139,890
200	786,164	0,220	139,780
400	1572,327	0,440	139,560
800	3144,654	0,881	139,119
1600	6289,308	1,761	138,239
3200	12578,616	3,522	136,478
6400	25157,233	7,044	132,956

Plomb : La concentration de la solution mère est de 0,1g/ml

[Pb ⁺²]	[Pb(OOCCH ₃) ₂ , 3H ₂ O]	VSM (ml)	VMH (ml)
400	732,332	1,025	138,975
800	1464,665	2,051	137,949
1600	2929,330	4,101	135,899
2400	4393,995	6,152	133,848
3200	5858,660	8,202	131,798
4000	7323,324	10,253	129,747

Cadmium : La concentration de la solution mère est de 0,1g/ml

[Cd ⁺²]	[3CdSO ₄ , 8H ₂ O]	VSM (ml)	VMH (ml)
12,5	28,526	0,040	139,960
25	57,052	0,080	139,920
50	114,103	0,160	139,840
100	228,206	0,319	139,681
200	456,413	0,639	139,361
400	912,825	1,278	138,722
800	1825,650	2,556	137,444

Zinc : La concentration de la solution mère est de 0,5g/ml

[Zn ⁺²]	[ZnSO ₄ , 7H ₂ O]	VSM (ml)	VMH (ml)
50	219,877	0,062	139,938
100	439,754	0,123	139,877
200	879,507	0,246	139,754
400	1759,015	0,493	139,507
800	3518,030	0,985	139,015
1600	7036,059	1,970	138,030
2400	10554,089	2,955	137,045
3200	14072,119	3,940	136,060

Annexe 04 : Résultats de l'identification des entérobactéries

Tableau N° I : Aspect des colonies d'entérobactéries sur milieux de culture

Espèces	Aspect des colonies	
	Mac Conkey	UriSelect4
<i>Kebsiella pneumoniae</i>	Colonie gronde rose avec muqueuse	Bleu foncé
<i>Entrobacter cloacae</i>	Colonie gronde rouge foncé	Violet ou bleu à reflet rose

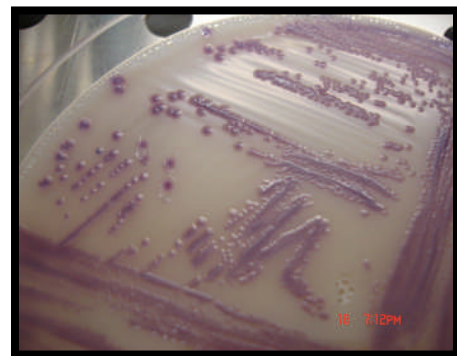
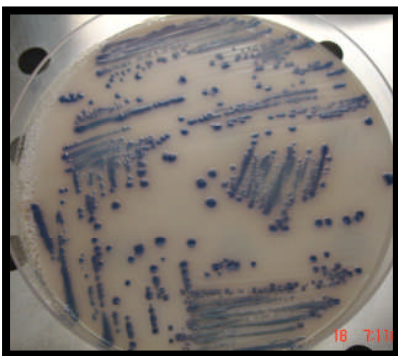


Figure 01 : Aspect des colonies du groupe KES (*Klebsiella*, *Serratia* et *Enterobacter*) sur URIselect 4

Tableau N° II : Résultats des tests biochimiques d'identification des entérobactéries

N°	Codes	KIA	Gaz	Cit	Nit	In	VP	RM	N°	Codes	KIA	Gaz	Cit	Nit	In	VP	RM
1	701	+	+	-	+	-	-	+	32	736	+	+	+	+	-	+	-
2	702	+	+	+	+	-	+	-	33	737	+	-	+	+	-	+	-
3	704	+	+	+	+	-	+	-	34	738	+	-	+	+	-	+	-
4	705	+	+	+	+	-	+	-	35	739	+	+	+	+	-	+	-
5	707	+	+	+	+	-	+	-	36	740	+	+	-	+	-	+	-
6	708	+	+	+	+	-	+	-	37	741	+	+	+	+	-	+	-
7	709	+	+	+	+	-	+	-	38	742	+	-	-	+	-	-	+
8	710	+	+	+	+	-	+	-	39	743	+	-	+	+	-	-	+
9	712	+	+	+	+	-	+	-	40	744	+	+	+	+	-	-	+
10	713	+	-	-	+	-	-	+	41	745	+	-	+	+	-	+	-
11	714	+	+	+	+	-	+	-	42	746	+	-	+	-	-	+	-
12	715	+	+	+	+	-	+	-	43	747	+	-	-	+	-	-	+
13	716	+	+	+	+	-	+	-	44	752	+	+	+	+	-	+	-
14	717	+	-	+	+	-	-	+	45	754	+	+	+	+	-	+	-
15	719	+	+	+	+	-	-	+	46	755	+	-	+	-	-	-	+
16	720	+	+	+	+	-	-	+	47	756	+	+	+	+	-	+	-
17	721	+	+	+	+	-	+	-	48	757	+	+	-	+	-	+	-
18	722	+	+	+	+	-	+	-	49	758	+	+	+	+	-	-	+
19	723	+	+	-	+	-	-	+	50	760	+	-	-	+	-	-	+
20	724	+	+	+	+	-	+	-	51	762	+	+	-	+	-	+	-
21	725	+	-	+	+	-	-	+	52	763	+	+	+	+	-	-	+
22	726	+	+	-	+	+	-	+	53	764	+	+	+	+	-	+	-
23	727	+	+	+	+	-	+	-	54	765	+	-	-	+	-	-	+
24	728	+	+	+	+	-	-	+	55	766	+	+	+	+	-	-	+
25	729	+	+	+	+	-	+	-	56	767	+	+	+	+	-	+	-
26	730	+	+	+	+	-	+	-	57	768	+	+	+	+	-	-	+
27	731	+	+	+	+	-	-	+	58	769	+	+	-	+	-	-	+
28	732	+	+	+	+	-	-	+	59	770	+	-	-	+	-	-	+
29	733	+	+	+	+	-	+	-	60	771	+	-	+	+	-	-	+
30	734	+	+	+	+	-	+	-	61	772	+	+	+	+	-	-	+
31	735	+	+	+	+	-	+	-	62	773	+	-	+	+	-	+	+

Tableau N° III : Lecture et interprétation des résultats de galerie API20E

TUBE	RÉACTIONS		COMMENTAIRES
	POSITIVE	NÉGATIVE	
ONPG	Jaune	Incolore	Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative.
ADH	Rouge ou orange	Jaune	
LDC	Rouge ou orange	Jaune	
ODC	Rouge ou orange	Jaune	
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pâle ou jaune	La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie).
H ₂ S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	
URE	Rouge ou orange	Jaune	
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction.
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement.
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pâle	Ajouter 1 goutte de KOH à 40% puis 1 goutte d'alpha-naphthol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion, incolore	La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative.
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobie du microtube (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive.

*K. pneumoniae* (714)*E. cloacae* (734)

Figure 02 : Exemple de résultat d'identification par galerie API20E

Annexe 05 : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier des hôpitaux de la wilaya de Bejaia

Tableau N° IV : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital d'Amizour

Codes	Services	Salles	Sites de prélèvement	Observations
704	CF	1	Lit 1	Draps changé depuis 3 jours
707	CF	1	Table du lit 1	Propre avec poussière
765	CF	5	Lit 6	Draps changé depuis 13 jours + sang et liquide biologique
708	MH	5	Table du lit 2	Sale avec poussière
714	MH	5	lit 7	Draps changé depuis 7 jours
715	MF	1	Table du lit 1	Draps changé depuis 4 jours
724	MF	3	Table du lit 2	Propre
716	MF	3	lit 3	Draps changé depuis 13 jours
709	Pédiatrie	2	Lit 1	Draps changé depuis 7 jours
754	Pédiatrie	2	Lit 2	Draps changé depuis 7 jours
751	Pédiatrie	2	Lit 2	Draps changé depuis 5 jours
721	Néonatalogie	2	Berceau	Occupé depuis 5 jours (prématuré)
705	Néonatalogie	2	Berceau	Occupé depuis 5 jours (prématuré)
702	Réa	1	Table du scope	Néant
729	Réa	2	Bocal d'aspiration	Néant

Tableau N° V : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital Frantz Fanon

Codes	Services	Salles	Sites de prélèvement	Observations
723	Pneumo-phtysio F	Salle d'eau	Evier	Néant
713	Pneumo-phtysio F	Salle d'eau	Evier	Néant
726	Pneumo-phtysio H	2	Table du lit 4	Poussière
753	Maxilo- Facial H	2	Berceau	Draps changé depuis 4 jours
748	Maxilo- Facial F	Salle d'eau	Poignée de porte	Néant
701	Maxilo- Facial	Salle d'eau	Poignée de porte	Néant
756	BOP centrale	1	Porte savon	Sous UV
758	ORL	Salle de soin	Bocal d'aspiration	Néant
757	ORL F	1	Lit 3	Draps changé depuis 7 jours

Tableau N° VI : Sites de prélèvement des souches d'entérobactéries au niveau de l'hôpital
Khelil Amrane

Codes	Services	Salles	Sites de prélèvement	Observations
719	CVF	3	Lit 2	Draps changé depuis 3 jours
732	CVF	3	Table du lit 2	Sale avec poussière
731	CVF	3	Lit 3	Draps changé depuis 10 jours
737	CVF	3	Table du lit 3	Sale avec poussière
730	CVF	4	Lit 4	Draps changé depuis 4 jours
722	CVF	5	Lit 5	Draps changé depuis 3 jours
736	CVF	5	Table du lit 6	Draps changé depuis 4 jours
741	CVF	5	Table du lit 6	Draps changé depuis 4 jours
743	CVH	6	Lit 6	Draps changé depuis 15 jours
728	CVH	Salle de soin	Table de soin	Néant
717	COF	2	Lit 1	Draps changé depuis 8 jours
745	COF	5	Lit 2	Draps changé depuis 2 jours
725	COH	1	Lit 1	Draps changé depuis 5 jours
734	COH	8	Table du lit 8	Propre
752	M F	5	Lit8	Draps changé depuis 8 jours
733	M F	9	Table du lit 18	Propre
768	M F	9	Table du lit 18	Propre
766	M F	Salle de soin	Paillasse	Néant
767	M F	Salle de soin	Paillasse	Néant
727	M F	Salle de soin	Paillasse	Néant
729	M H	Salle de soin	Paillasse	Néant
760	M H	Salle de soin	Cardiogramme	Néant
762	BOP	2	Bocal d'aspiration	Sous UV toute la nuit
744	Pédiatrie	4	Lit 2	Draps changé depuis 3 jours
746	Pédiatrie	3	Lit 3	Draps changé depuis 2 jours
710	Pédiatrie	3	Berceau	Néant
764	Pédiatrie	3	Berceau	Néant
763	Pédiatrie	3	Berceau	Néant
750	Pédiatrie	2	Table du malade	Poussière
755	Pédiatrie	Salle de soin	Paillasse	Néant
747	Pédiatrie	Salle de soin	Paillasse	Néant
738	Pédiatrie	Salle de soin	Paillasse	Néant
739	Réa	3	Lit 1	Draps changé depuis 15 jours
720	Réa	3	Lit 1	Draps changé depuis 15 jours
735	Réa	3	Bocal d'aspiration	Néant
740	Réa	3	Table dut lit 1	Néant
742	Réa	4	Tuyauterie à O ₂	Néant
712	Réa	4	Tuyauterie à O ₂	Néant

Résumé :

Au cours de cette étude réalisée au niveau de trois hôpitaux de la wilaya de Bejaia, 62 souches d'entérobactéries sont isolées et identifiées à partir de 428 prélèvements de surfaces inanimées de l'environnement hospitalier. Elles sont isolées essentiellement des draps de lits et des tables de malades de différents services.

L'étude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis du céfotaxime et céftazidime a permis de sélectionner 33 souches résistantes à ces molécules. Parmi ces souches, 16 sont productrices de BLSE dont 14 *E. cloacae* et 02 *K. pneumoniae*. 12 souches sont productrices d'une BLSE de type CTX-M-15 et 04 produisent le type SHV-12. Elles sont toutes résistantes à la gentamicine, à la tobramycine et à la rifampicine.

L'étude de la résistance de ces souches aux métaux lourds montre que toutes les souches sont sensibles au zinc et résistantes au cuivre. Seules 2 souches sont résistantes au plomb, 4 au mercure et 5 au cadmium. Une association entre la tolérance au cuivre et la résistance aux aminosides, aux β -lactamines et à la rifampicine est observée chez toutes les souches BLSE. Le transfert des gènes *bla*_{CTX-M} par conjugaison n'est obtenu que pour une seule souche d'*E. cloacae*.

Mots clés : BLSE, entérobactéries, environnement hospitalier, métaux lourds, résistance, surfaces inanimées.

Abstract

During this study, 62 strains of *Enterobacteriaceae* were isolated and identified from 428 samples recovered from inanimate surfaces of hospital environment. They are mostly isolated from bed linen and tables of the patients from different ward.

The evaluation of the sensitivity of these strains to cefotaxime and ceftazidime showed that 33 strains were resistant to them. Among these, 16 strains including 14 *E. cloacae* and 02 *K. pneumoniae* are ESBL producing. 12 strains produced CTX-M-15 ESBLs and 04 produced SHV-12. All the strains are resistant to gentamicin, tobramycin and rifampicin.

The resistance study of the resistance of these strains to heavy metal shows that all of the strains are sensitive to zinc and resistant to copper. Only two strains are resistant to lead, four to mercury and five to cadmium. An association between copper tolerance and resistance to aminosides, β -lactams and rifampicin are observed in all ESBL strains. The transfer of genes *bla*_{CTX-M} by conjugation is obtained for one strain of *E. cloacae*.

Key words: *Enterobacteriaceae*, ESBLs, heavy metal, Hospital environment, inanimate surfaces, resistance.

المخلص

خلال هذا العمل قمنا بدراسة 62 سلالة من *Enterobacteriaceae* التي تم عزلها من 428 عينة على مستوى السطوح الجامدة لبيئة ثلاثة مستشفيات بولاية بجاية. لقد تم عزلهم في الغالب من فرائش و طاوولات المرضى من مختلف الاقسام. دراسة حساسية هذه السلالات بالنسبة الى *céftazidime* و *céfotaxime* مكنتنا من اختيار 33 سلالة مقاومة لهذه الجزينات، من بينها 16 سلالة منتجة لى BLSE بما في ذلك 14 *E. cloacae* و 02 *K. pneumoniae*. تم الكشف على 12 سلالة منتجة للأنزيمات BLSEs من نوع CTX-M-15 و 04 من نوع SHV-12. جميع هذه السلالات تظهر مقاومة لى *gentamicine* و *tobramycine*، *rifampicine*.

دراسة مقاومة هذه السلالات للمعادن الثقيلة تظهر ان جميعها حساسة بالنسبة الى الزنك و مقاومة للنحاس. سلالتين تظهر مقاوم للرصاص و 4 للزئبق و 5 للكاديوم. لقد لوحظ خلال هذه الدراسة وجود ارتباط بين مقاومة جميع سلالات BLSE للنحاس ولى *aminosides*، β -*lactamines*، *rifampicine*. تم نقل الجينات *bla*_{CTX-M} بالنسبة لسلالة واحدة من *E. cloacae*.

الكلمات الرئيسية : بيئة المستشفى، المعادن الثقيلة ESBL، السطوح الجامدة، *Enterobacteriaceae*،

المقاومة، المضادات الحيوية

