



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr-BELKAÏD-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

Présenté par

M^{lle} Bechar Fatma

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

**Contribution à l'étude d'une collection de souches cliniques
de bactéries à Gram négatif**

Soutenu le 18 Juillet 2024, devant le jury composé de :

Dr. Mezouar Dounia	Présidente	Université de Tlemcen
Dr. Kazi Tani-Baba Ahmed Zahira Zakia	Encadreur	Université de Tlemcen
Dr. Aissaoui Mohammed	Examineur	Université de Tamanrasset

Année universitaire 2023/2024

Dédicaces

A ceux qui nous ont indiqué la bonne voie en nous rappelant que la volonté fait toujours les grands hommes et grandes femmes...mes chers parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de toutes les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance. Je vous aime, que dieu vous accorde une vie longue et heureuse avec une bonne santé.

A mon frère et mes chères sœurs qui m'ont encouragé dans tout ma vie, aucun dédicace ne serait exprimer l'amour que j'ai pour vous. Que dieu vous garde et vous protège.

A mon chère fiancé qui m'a toujours soutenir quand j'en ai besoin et à pousser pour ne jamais abandonner et à continuer

A mes amies Imene, Bouchra, Nouria, Sara, Nawter, Loubna ; merci pour leur amitié et pour les bons moments

A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime.

De tout mon cœur, je vous dédie ce modeste travail.

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à **Madame Kazi Tani - Baba Ahmed Z.Z.**, Maitre de conférences classe A, au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Terre et de l'univers de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, pour son encadrement, son soutien inestimable et ses précieux conseils tout au long de ce travail de recherche. Ce mémoire n'aurait pas été possible sans son optimisme et ses conseils avisés, ses remarques pertinentes et ses encouragements.

Mes sincères remerciements à **Mademoiselle Mezouar D.**, Maitre de conférences classe A au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Je la remercie pour son enseignement, ses encouragements et ses précieux conseils.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à **Monsieur Aissaoui M.**, Maitre de conférences classe B au département de Biologie Université de Tamanrasset, pour avoir accepté d'examiner et évaluer ce travail.

Je remercie également la doctorante Benatia Fatima Zohra pour son aide durant la réalisation de la partie pratique, et tous les membres du laboratoire : Antibiotiques Antifongiques physico-chimie, synthèse et activité biologique, pour leur soutien.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل هو أولاً تحديد مجموعة من السلالات البكتيرية سالبة الجرام التي تنتمي إلى مختبر أبحاث "المضادات الحيوية ومضادات الفطريات: الكيمياء الفيزيائية والتركيب والنشاط البيولوجي"، وثانياً دراسة خصائص مقاومتها للمضادات الحيوية وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية. كشفت نتائج تحديد الهوية عن (5) سلالات من بكتيريا *Enterobacter cloacae*، و(3) سلالات من بكتيريا *Klebsiella pneumoniae*، و(1) سلالة من بكتيريا *Klebsiella oxytoca*، و(1) سلالة من بكتيريا *Serratia marcescens*. وأظهر تحليل الأنماط الظاهرية للمقاومة وجود أنماط ظاهرية لمقاومة إنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL)، وبيتا لاكتاماز ممتد الطيف المرتبط بإنزيم السيفالوسبوريناز (Case +ESBL). كشفت دراسة قدرة السلالات على تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة أن (9) سلالات صُنفت على أنها شديدة التكوين للأغشية الحيوية الرقيقة في المختبر.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا سالبة الجرام، السيفالوسبوريناز الممتد الطيف بيتا لاكتاماز (ESBL)، السيفالوسبوريناز (Case)، الأغشية الحيوية

Résumé

Ce travail avait pour but d'identifier dans un premier temps une collection de souches de bactéries Gram négatives appartenant au laboratoire de recherche "Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique" et dans un second temps d'étudier leurs profils de résistance aux antibiotiques ainsi que leurs capacités à former des biofilms. Les résultats d'identification ont permis de mettre en évidence (5) souches d'*Enterobacter cloacae*, (3) souches de *Klebsiella pneumoniae*, (1) souche de *Klebsiella oxytoca* et (1) souche de *Serratia marcescens*. L'analyse des phénotypes de résistance a montré les phénotypes β -lactamase à spectre élargi (BLSE) et β -lactamase à spectre élargi associé à une céphalosporine (BLSE+ Case). L'étude de la capacité des souches à former des biofilms a révélé que (9) souches étaient catégorisées fortement formatrices de biofilms *in vitro*.

Mots clés : Bactéries Gram négatives, β -lactamase à spectre élargi (BLSE), céphalosporines (Case), biofilms.

Abstract

The aim of this work was firstly to identify a collection of Gram-negative bacterial strains belonging to the "Antibiotics, Antifungals: physico-chemistry, synthesis and biological activity" research laboratory and secondly to study their antibiotic resistance profiles and their ability to form biofilms. The identification results revealed (5) strains of *Enterobacter cloacae*, (3) strains of *Klebsiella pneumoniae*, (1) strain of *Klebsiella oxytoca* and (1) strain of *Serratia marcescens*. Analysis of the resistance phenotypes showed the β -lactamase extended spectrum (ESBL) and β -lactamase extended spectrum associated with a cephalosporinase (ESBL+ Case) phenotypes. Study of the ability of strains to form biofilms revealed that (9) strains were categorised as strongly biofilm-forming in vitro.

Key words: Gram-negative bacteria, extended-spectrum β -lactamase (ESBL), cephalosporinase (Case), biofilms

Liste des abréviations

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

Case: Céphalosporinase

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ampC : Gène de céphalosporinase de classe C

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

TSI: Triple Sugar Iron Agar

DO : Densité optique

Liste des tableaux et des Figures

- Tableau 1.** Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries étudiées **10**
- Figure 1.** Représentation schématique de la formation d'un biofilm buccal (Huang et coll., 2011) **03**
- Figure 2.** Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches étudiées **12**

SOMMAIRE

Première partie: Synthèse bibliographique.....	1
Deuxième partie: Matériel et méthodes	6
1. Souches étudiées.....	6
2. Revivification et purification	6
3. Identification	6
3.1. Coloration de Gram.....	6
3.2. Test TSI.....	6
3.3. Galerie API 20E.....	7
4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (CLSI, 2020).....	7
4.1. Antibiogramme.....	7
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	7
5. Formation de biofilms <i>in vitro</i>	7
Troisième partie: Résultats et discussion.....	9
1. Identification bactérienne.....	9
2. Sensibilité aux antibiotiques	9
3. Formation des biofilms <i>in vitro</i>	12
Quatrième partie: Conclusion	14
Cinquième partie: Références bibliographiques	15

Première partie

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

La cavité buccale de l'homme est un mini écosystème qui représente le premier segment du tube digestif **(Alghamdi, 2022)**. Elle englobe toutes les structures anatomiques de la bouche, telles que les lèvres, les joues, la gencive, la langue, le palais et les dents **(Alamri et coll., 2022)**.

Sur le plan microbiologique, la cavité buccale constitue un milieu complexe qui renferme une flore microbienne riche et variée. La présence de plus de 700 espèces bactériennes différentes dans cet écosystème microbien joue un rôle crucial dans le maintien de la santé buccale **(Lamont et coll., 2018)**.

La flore microbienne buccale, composée non seulement de bactéries mais aussi d'archées, de champignons, de virus et de quelques protozoaires **(Marsh et Zaura, 2017)**, trouve dans la cavité buccale des conditions favorables à sa croissance grâce à l'humidité, la température et l'apport constant de nutriments par la salive et la nourriture **(Rajakumari et Kumari, 2015)**. La quantité et la virulence de cette flore diffèrent selon les individus, les conditions locales et l'état général des sujets **(Boudjellal et coll., 2020)**.

La flore microbienne buccale est en équilibre avec l'hôte et joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie chez les personnes saines. Toutefois, une rupture de cet équilibre, provoquée par des modifications de l'environnement ou des perturbations de l'hôte, peut entraîner la formation d'infections buccales **(Lamont et coll., 2018)**.

Les infections bucco-dentaires sont les maladies non transmissibles les plus fréquentes. Elles représentent un problème majeur de santé publique. Elles peuvent causer des douleurs de différentes intensités, des déformations et parfois même la mort **(OMS, 2018)**

L'âge du patient, son genre, ses habitudes alimentaires, son niveau d'hygiène bucco-dentaire ainsi que d'autres paramètres sont parmi les principaux facteurs déterminants l'incidence de ces infections buccales **(Pognon et coll., 2013)**.

Chez les enfants immunodéprimés, affaiblis par des maladies telles que le cancer, les déficits immunitaires ou les maladies auto-immunes, un déséquilibre de la flore microbienne les rend vulnérables aux infections bucco-dentaires **(Marsh et coll., 2017 ; Alamri et coll., 2022)**.

Synthèse bibliographique

La carie dentaire est considérée comme la maladie chronique la plus courante. Elle affecte directement les tissus dentaires. Sa prévalence a augmenté chez les enfants de 2 à 5 ans dans le monde. Cependant, les caries ne se produiront qu'en présence d'une communauté microbienne cariogène (c'est-à-dire pathogène) et d'une exposition fréquente aux glucides alimentaires **(Marsh et coll., 2017)**.

Les parodontites sont des affections inflammatoires persistantes de la cavité buccale qui touchent les structures entourant et soutenant les dents. Elles sont majoritairement liées à une augmentation de la proportion de bactéries Gram négatives **(Lê et coll., 2024)**.

La mucosite buccale, qui consiste en des lésions douloureuses de la muqueuse de la bouche, est une conséquence fréquente des traitements de chimiothérapie qui peut être aggravée par des infections bactériennes, notamment celles des bactéries Gram négatives **(Al-Dasooqi et coll., 2013 ; El Bousaadani et coll., 2016)**

Les entérobactéries sont des bactéries Gram négatives capables de provoquer des infections bucco-dentaires. Certaines souches sont intrinsèquement pathogènes, tandis que d'autres profitent de conditions favorables pour se développer de manière opportuniste. Ces dernières peuvent ainsi causer des septicémies ou des infections à distance du foyer initial bucco-dentaire, notamment chez les personnes immunodéprimées, dans un environnement hospitalier ou à la suite d'une intervention chirurgicale buccale **(Renoux et coll., 2016)**.

Les entérobactéries, un groupe de bactéries aéro-anaérobies facultatives, sont des membres transitoires ou non-résidents de la cavité buccale chez les individus en bonne santé. Leur présence peut être due à l'ingestion d'eau potable, d'aliments contaminés ou d'une mauvaise hygiène personnelle **(Chinnasamy et coll., 2019)**.

De nombreuses recherches sur les entérobactéries dans l'écosystème buccal ont montré qu'elles peuvent persister dans l'environnement sous-gingival après un débridement parodontal et une intervention chirurgicale. Elles sont généralement liées à la parodontite orale des patients immunodéprimés qui ont présenté des infections des muqueuses **(Zaatout, 2021)**.

Synthèse bibliographique

Kaboré et ses collaborateurs ont montré en 2016 que *Klebsiella sp.* est l'une des souches d'entérobactéries perçue comme un pathogène opportuniste émergent, impliquée dans différentes infections bucco-dentaires, tels les abcès parodontaux, les gingivites, les stomatites ou les infections causées par des actes bucco-dentaires.

Chez les porteurs des prothèses dentaires particulièrement, les souches de *Klebsiella sp.* de même que celles d'*Enterobacter sp.* sont responsables d'odeurs nauséabondes (**Rajakumari et coll., 2015**).

La plupart des micro-organismes ne peuvent se maintenir dans la cavité buccale que lorsqu'ils adhèrent aux tissus durs ou mous où se forme un biofilm. Ce dernier est constitué d'un groupe de micro-organismes capable d'adhérer sur différentes surfaces, telles que les dents et les dispositifs médicaux oraux. La plaque dentaire représente le biofilm le plus accessible dans la cavité buccale (**Marsh, 2006**).

D'après **Huang et ses collaborateurs (2011)**, (**Figure 1**), la première étape de la formation du biofilm buccal est la fixation de la pellicule acquise, qui est une fine protéine contenant un film dérivé des glycoprotéines salivaires, à une surface dentaire propre. Elle est suivie de la liaison réversible de certaines bactéries planctoniques aux protéines de la pellicule via des attractions électrostatiques et physiques initiales.

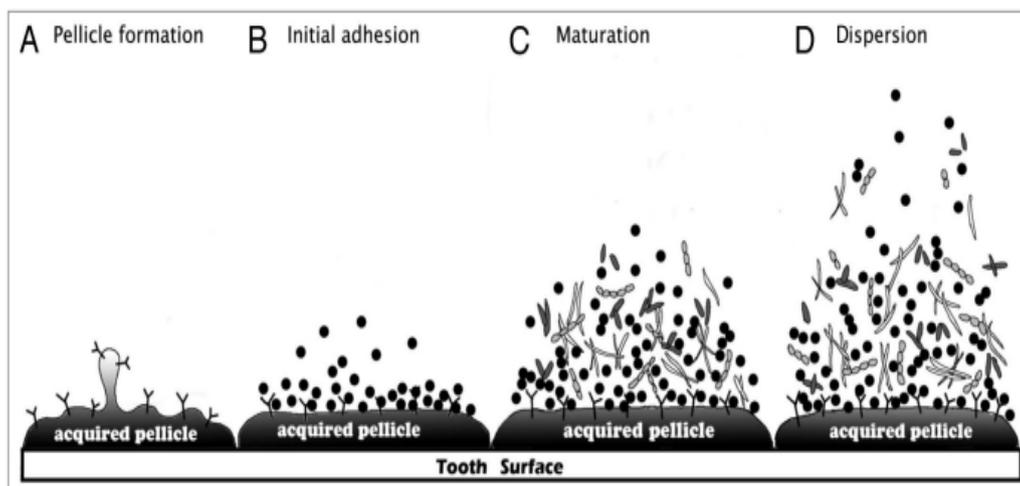


Figure 1. Représentation schématique de la formation d'un biofilm buccal (**Huang et coll., 2011**)

Synthèse bibliographique

Une fois attachées, ces bactéries pionnières commencent à sécréter une matrice extracellulaire (EPS) permettant une adhésion plus forte et irréversible. Cette colonisation précoce utilise des structures d'adhérence, et implique différentes forces de liaison. Elle permet à ces espèces d'occuper les surfaces dentaires, de se co-agréger et de former des biofilms matures. Dans ce dernier, les bactéries quittent le biofilm par détachement d'une seule cellule ou d'un groupe de cellules, et se propagent pour coloniser de nouveaux sites **(Huang et coll., 2011)**.

Les entérobactéries possèdent divers facteurs de virulence qui facilitent la formation et le développement des biofilms buccaux :

- ✓ Les fimbriaes de types 5 et 6 retrouvés chez les souches de *klebseilla sp.* sont des adhésines permettent l'adhésion initiale des bactéries aux surfaces dentaires, muqueuses et prothèses **(Thanassi et coll., 2007)**.
- ✓ Les lipopolysaccharides (LPS) sont considérés comme des endotoxines, et sont présentes à la surface des bactéries à Gram négatif **(Munford, 2008)**.
- ✓ Les sidérophores sont utilisés pour acquérir le fer qui représente un nutriment essentiel pour leur croissance et leur virulence **(Miethke et Marahiel, 2007)**.
- ✓ Le quorum sensing est un système de communication inter-cellulaire qui régule l'expression des gènes impliqués dans la production de la matrice extracellulaire, la maturation du biofilm ainsi que d'autres processus liés au biofilm **(Ng et Bassler, 2009)**.

Le biofilm buccal renferme environ 100 million de bactéries, ce qui suggère que ces bactéries sont probablement libérées dans la salive et aspirées dans les voies respiratoires inférieures pour ensuite causer des infections **(Paju et Scannapieco, 2007)**.

La sévérité de ces infections se traduit par des problèmes de prise en charge liés à leur détection et à leur résistance aux antibiotiques **(Kaboré et coll., 2016)**. Le milieu buccal riche en biofilms favorise le transfère horizontal de gènes de résistance entre les entérobactéries et d'autres types de bactéries. Ce phénomène amplifie le problème de la résistance en tant que source de gènes de résistance **(Roberts et Mullany, 2010)**.

Synthèse bibliographique

La résistance aux antibiotiques β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif est principalement influencée par la production de β -lactamases (**Bush, 2018**). Ces enzymes hydrolysent le noyau β -lactame des antibiotiques et les rendent inefficaces. Les types majeurs incluent les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), les céphalosporinases, et les carbapénémases. Cette résistance est aggravée par d'autres mécanismes comme la réduction de la perméabilité membranaire et les systèmes d'efflux (**Bonomo et coll., 2017**).

La résistance aux antibiotiques a des implications cliniques importantes, compliquant le traitement des infections orales et augmentant le risque d'infections systémiques, notamment chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés (**Tada et Hanada, 2010**).

Notre travail s'inscrit dans cet ordre d'idée et consiste à identifier dans un premier temps une collection de souches de bactéries à Gram négatif isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés et appartenant au laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique LapSab », et dans un second temps d'étudier leurs profils de résistance aux antibiotiques ainsi que leurs capacités à former des biofilms *in vitro*.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique LapSab » de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

1. Souches étudiées

Le matériel biologique est constitué d'une collection de bactéries à Gram négatif isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés. Ces bactéries sont entretenues par repiquage régulier et conservées à 4°C au laboratoire LapSab.

2. Revivification et purification

La revivification permet de régénérer une culture viable à partir d'une souche conservée à 4°C. Un milieu de culture approprié est inoculé avec un échantillon de la souche conservée et incubé jusqu'à l'observation d'une croissance bactérienne. Des repiquages successifs sont ensuite réalisés sur milieu gélosé pour isoler des colonies bien distinctes provenant d'une seule cellule initiale. Une colonie représentative est ensuite sélectionnée et remise en culture pour disposer d'un inoculum pur de la souche bactérienne.

3. Identification

L'identification des souches est réalisée par coloration de Gram et des tests biochimiques, le Triple Sugar Iron (TSI) et les galeries API 20E.

3.1. Coloration de Gram

Une goutte de culture bactérienne de 24 heures est séchée et fixée sur une lame de verre. Ensuite, les bactéries sont colorées avec du cristal violet et contre colorées avec de la fushine. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement de 400.

3.2. Test TSI

Ce test permet d'étudier la fermentation des trois sucres (glucose, lactose, saccharose), avec ou sans production de gaz et du sulfure d'hydrogène. L'ensemencement est réalisé par des stries serrées au niveau de la pente avec une pique centrale au niveau du culot. Après une incubation à 37°C pendant 18h à 24h, la fermentation sucrée se traduit par une acidification du milieu qui fait virer au jaune l'indicateur de pH, la production de gaz se traduit par formation de bulle de gaz dans la masse du culot, la production H₂S se traduit par le noircissement du milieu.

3.3. Galerie API 20E

La galerie API 20E est une méthode d'identification rapide des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent de réaliser 20 tests biochimiques. L'ensemencement des 20 microtubes de la galerie est réalisé par une suspension bactérienne équivalente à 10^8 UFC/mL. Après 18 à 24 heures d'incubation, la lecture des réactions produites est réalisée en se référant aux tableaux de lecture et d'identification.

4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (CLSI, 2020)

4.1. Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé par la technique de diffusion des antibiotiques sur milieu gélosé Mueller-Hinton. Des disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose préalablement ensemencée avec un inoculum de 10^8 UFC/mL de la souche à tester. Après 18 à 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés afin de déterminer les catégories cliniques et les phénotypes de résistance associés.

4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques, amoxicilline, amoxiciline + acide clavulanique, céfotaxime, céftazidime, imipénème et gentamicine est réalisée par la méthode de micro-dilution sur microplaque 96 puits. Les antibiotiques sont préparés en extemporanés dans de l'eau distillée stérile. Les concentrations finales varient de 0,125 à 256 μ g/mL. Les inocula de 10^6 UFC/mL sont mis au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

Après une incubation de 18 à 24 heures à 37°C, la CMI est définie comme étant la plus petite concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu.

5. Formation de biofilms *in vitro*

L'étude de la capacité des souches à former des biofilms *in vitro*. Cette technique permet de mesurer la quantité de biomasse présente à l'intérieur du biofilm par le Crystal violet (**Christensen et coll., 1985**).

La formation des biofilms est réalisée dans des microplaques 96 puits à fond plat. Cent μ l d'un inoculum de 10^7 UFC/mL préparé dans le BHIB, sont mis dans chaque puits de la microplaque à l'exception du dernier puits qui contient le milieu BHIB seul

Matériel et méthodes

(contrôle négatif). Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, le surnageant est aspiré et les puits sont lavés deux fois avec le PBS (pH 7,4:10mM) stérile, puis 100µL de méthanol sont ajoutés. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et 100µL d'une solution de Crystal violet sont ajoutés et laissés pendant 20 minutes. Le Crystal violet lié est libéré par addition de 150µL de l'acide acétique (33%).

La lecture de la densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaque à 570 nm

Les souches sont classées selon **(Christensen et coll., 1985)** comme suit :

DO < 0.12 : non formatrice de biofilm

0.12 < DO < 0.24 : Modérée

DO > 0.24 : fortement formatrice de biofilm

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Identification bactérienne

Le présent travail a porté sur une collection de 10 souches de bactéries Gram négatives appartenant au laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique LapSab ».

L'identification de la collection de souches nous a permis d'assigner 5 souches au genre espèce *Enterobacter cloacae*, 3 souches au genre espèce *Klebsiella pneumoniae*, 1 souche au genre espèce *Klebsiella oxytoca* et 1 autre souche au genre espèce *Serratia marcescens*.

Le biotypage a permis de regrouper les 5 souches d'*Enterobacter cloacae* dans un même biotype 3305573 suggérant une population bactérienne homogène qui pourrait indiquer une source commune d'infection ou de colonisation.

La comparaison des biotypes des souches de *Klebsiella pneumoniae* a permis de classer les souches en deux groupes. Le premier est représenté par le biotype 5215773 et regroupe 2 souches (Kpm2, Kpm3). Le second est représenté par le biotype 5215573 et est représenté par une seule souche (Kpm1). Ce résultat peut être en faveur d'une diversité génétique au sein des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées.

Le biotypage phénotypique reste une méthode essentielle pour caractériser la diversité des souches d'entérobactéries. Il permet d'identifier non seulement les variations biochimiques et métaboliques au sein d'une même espèce, mais fournit également des informations cruciales pour la surveillance épidémiologique (**Meradi et coll., 2011 ; Touati et coll., 2017**).

2. Sensibilité aux antibiotiques

Nous avons évalué la sensibilité des souches d'entérobactéries étudiées par la méthode de diffusion en milieu gélosé et la méthode de micro-dilution sur microplaque 96 puits (**CLSI, 2020**) vis-à-vis des molécules d'antibiotiques appartenant aux familles β -lactamines et aminosides.

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques sont représentés dans le **tableau N° 2**.

Résultats et discussion

Tableau 2. Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries étudiées

souche	β-lactamines											Phénotypes	Aminosides			
	<u>AMX</u>		<u>AMC 3</u>		<u>TIC</u>	<u>PIP</u>	<u>CAZ</u>		<u>CTX</u>	<u>ATM</u>	<u>IMI</u>		<u>CN</u>		<u>TOB</u>	
	µg/ml	mm	µg/ml	mm	mm	mm	µg/ml	µg/ml	mm	mm	µg/ml		mm	µg/ml	mm	
S≥ R≤	S≥18 R≤13	S≤8/4 R≥32/16	S≥22 R≤20	S≥21 R≤17	S≥21 R≤17	S≤4 R≥16	S≤1R≥4	S>23R<21	S≥23R≤19	S≤1R≥4	S≥15 R≤12	S≤4 R 16	R<15<S			
ECL 1	>256 R	18 S	4 S	6 R	8 R	29 S	2 S	64 R	20 R	24 S	1 S	BLSE	24 S	<0,25 S	22 S	
ECL 2	64 R	18 S	4 S	6 R	6 R	24 S	4 S	32 R	27 S	25 S	1 S	BLSE	23 S	<0,25 S	19 S	
ECL 3	>256 R	6 R	64 R	6 R	6 R	23 S	4 S	4 R	27 S	24 S	1 S	BLSE+Case	21 S	<0,25 S	19 S	
ECL 4	128 R	6 R	32 R	6 R	6 R	28 S	0,25 S	8 R	27 S	30 S	0,5 S	BLSE+Case	24 S	<0,25 S	20 S	
ECL5	>256 R	19 S	4 S	16 R	6 R	27 S	2 S	32 R	19 R	23 S	1 S	BLSE	21 S	<0,25 S	21 S	
KPM 1	64 R	6 R	32 R	6 R	6 R	25 S	2 S	4 R	31 S	24 S	1 S	BLSE+Case	22 S	<0,25 S	22 S	
KPM 2	256 R	8 R	16 R	6 R	6 R	16 R	16 R	64 R	16 R	23 S	1 S	BLSE+Case	21 S	<0,25 S	21 S	
KPM 3	128 R	6 R	128 R	6 R	6 R	16 R	16 R	4 R	30 S	25 S	0,5 S	BLSE+Case	22 S	<0,25 S	21 S	
KOX	32 R	20 S	0,25 S	11 R	6 R	25 S	1 S	4 R	30 S	25 S	0,5 S	BLSE	25 S	<0,25 S	19 S	
Sm1	16 R	18 S	4 S	6 R	6 R	27 S	0,25 S	32 R	35 S	25 S	1 S	BLSE	23 S	<0,25 S	15 S	

R : Résistance ; **S** : Sensible ; **AMX** : amoxicilline ; **AMC** : amoxicilline + Acide clavulanique ; **TIC** : ticarcilline ; **PIP** : peperacillin ; **CAZ** : Céftazidime ; **CTX** : céfotaxime ; **ATM** : Aztreonam ; **IMI** : Imipenème ; **CN** : Gentamicine ; **TOB** : Tobramycine ; **BLSE** : β-lactamases à spectre étendu ; **Case** : céphalosporinase

Résultats et discussion

L'étude des profils de résistance aux antibiotiques a permis de mettre en évidence une bonne concordance entre les résultats de l'antibiogramme et ceux des CMI pour les antibiotiques amoxicilline + acide clavulanique, imipénème, ceftazidime, céfotaxime ainsi que la gentamicine.

Nous remarquons que l'ensemble des souches d'entérobactéries étudiées présentent une résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline, à la pipéracilline ainsi qu'au céfotaxime. Cinq souches (Ecl3, Ecl4, Kpm1, Kpm2, Kpm3) présentent une résistance à l'amoxicilline + acide clavulanique, 3 souches (Ecl1, Ecl5, Kpm2) à l'aztréonam et 2 souches (Kpm2, Kpm3) à la ceftazidime. Aucune résistance n'a été enregistrée pour les molécules imipénème, gentamicine et tobramycine.

L'analyse des phénotypes de résistance nous a permis de mettre en évidence le phénotype BLSE chez les souches *Enterobacter cloacae* 1, *Enterobacter cloacae* 2 et *Enterobacter cloacae* 5, *Klebsiella oxytoca* et *Serratia marcescens* 1 et le phénotype BLSE + Case chez les souches *Enterobacter cloacae* 3, *Enterobacter cloacae* 4, *Klebsiella pneumoniae* 1, *Klebsiella pneumoniae* 2 et *Klebsiella pneumoniae* 3.

La résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline, à la pipéracilline et au céfotaxime suggère la présence de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries (**Tacconelli et coll., 2018**). Tandis que la résistance à l'association amoxicilline/acide clavulanique, suggère la présence de différents types de β -lactamases principalement des β -lactamases de type AmpC (céphalosporinases) (**Drawz et Bonomo, 2010**). L'incidence des entérobactéries productrices de BLSE seule ou associée a augmenté dans le monde entier. Elle affecte non seulement le choix des antibiotiques, mais peut également entraîner une morbidité excessive, une mortalité et une crise économique (**Aklilu et coll., 2020**).

L'imipénème, la gentamicine et la tobramycine présentent un profil particulier avec une sensibilité de toutes les souches d'entérobactéries étudiées, ce qui pourrait être dû à l'absence de mécanismes de résistance aux carbapénèmes et des enzymes modifiant les aminosides (**Ramirez et coll., 2010 ; Nordmann et coll., 2011**). Selon **Souna et ses collaborateurs (2011)**, les carbapénèmes sont considérées comme des traitements de choix des infections causées par les entérobactéries.

3. Formation des biofilms *in vitro*

Les biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches de bactéries Gram négatives étudiées sont représentées sur la **figure 2**.

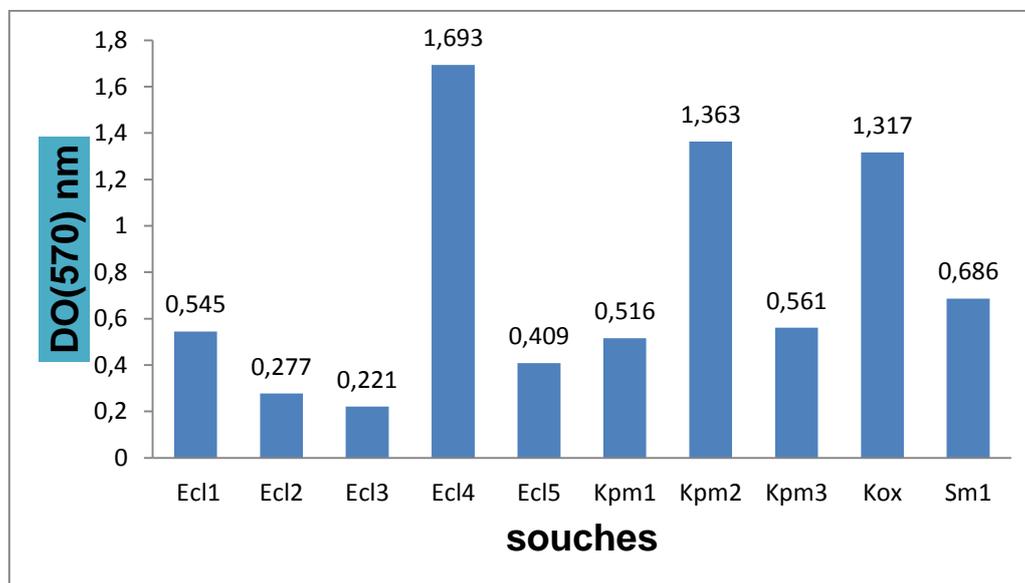


Figure 2. Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches étudiées

Quatre souches d'*Enterobacter cloacae* (Ecl1, Ecl2, Ecl4, Ecl5) se sont révélées fortement formatrices de biofilms, avec des densités optiques allant de 0,277 à 1,693 nm. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui rapporte que l'*Enterobacter cloacae* est un important producteur de biofilm (**Mezzatesta et coll., 2012**). Cependant, une capacité modérée de la souche *Enterobacter cloacae* 3 à former les biofilms souligne la variabilité intra-espèce dans la formation de biofilms (**Liu et coll., 2022**).

Toutes les souches de *Klebsiella* (Kpm1, Kpm2, Kpm3, Kox) ont montré une forte capacité à former des biofilms. Les densités optiques enregistrées étaient de 0,516 à 1,363 nm. La production de biofilms chez *Klebsiella sp* est souvent associée à la présence de fimbriae de types 1 et 3 (**Vuotto et coll., 2014**).

Résultats et discussion

La souche *Serratia marcescens* a également présenté une forte capacité à former des biofilms avec une densité optique de 0,686 nm. La formation de biofilm chez *Serratia marcescens* est souvent liée à la production de fimbriae et d'exopolysaccharides. Cette espèce est connue pour sa capacité à produire des biofilms, ce qui contribue à sa persistance cliniques (**Labbate et coll., 2007**).

Selon Pullen, (2018) en raison de la diminution des défenses immunitaires, les entérobactéries peuvent créer des biofilms plus solides et plus résistants dans la cavité buccale des patients immunodéprimés.

Quatrième partie

Conclusion

Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude d'une collection de souches de bactéries Gram négatives isolées de la cavité buccale d'enfants immunodéprimés et appartenant au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physicochimie, synthèse et activité biologique »

Il ressort de ce travail :

- ✓ L'identification de (5) souches d'*Enterobacter cloacae*, (3) souches de *Klebsiella pneumoniae*, (1) souche de *Klebsiella oxytoca* et une (1) de *Serratia marcescens*.
- ✓ La mise en évidence des phénotypes β -lactamase à spectre élargi (BLSE) et β -lactamase à spectre élargi associé à une céphalosporinase (BLSE+ Case).
- ✓ L'absence de résistance aux molécules antibiotiques imipénème, gentamicine et tobramycine.
- ✓ Une forte capacité de 9 souches d'entérobactéries étudiées à former les biofilms *in vitro*. Seule la souche *Enterobacter cloacae* 3 était catégoriser modérément formatrice de biofilms.

Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant d'élargir le panel des souches étudiées, de recourir à des techniques de biologie moléculaire pour l'identification des gènes de résistance aux antibiotiques d'une part, et d'autre part de caractériser les gènes de virulence responsable de l'adhésion et de la formation des biofilms en milieu bucco-dentaire.

Cinquième partie

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aklilu, A., Manilal, A., Ameya, G., Woldemariam, M., & Siraj, M. (2020).** Gastrointestinal tract colonization rate of extended-spectrum beta-lactamase-and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and associated factors among hospitalized patients in Arba Minch General Hospital, Arba Minch, Ethiopia. *Infection and drug resistance*, 1517-1526.
- Alamri, H. (2022).** Soins buccodentaires pour les enfants ayant des besoins particuliers en dentisterie : une revue de la littérature. *Journal de médecine clinique*, 11(19), 5557.
- Al-Dasooqi, N., Sonis, S. T., Bowen, J. M., Bateman, E., Blijlevens, N., Gibson, R. J., (2013).** Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Supportive care in cancer*, 21, 2075-2083.
- Alghamdi, (2022).** Isolation and identification of the oral bacteria and their characterization for bacteriocin production in the oral cavity. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 318-323.
- Bonomo, R. A. (2017).** β -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a025239.
- Boudjellal, H. A., Melzi, M. A., Berouaken, S., Meddah, S., Abdi, S., & Bounedjar, A. (2020).** Le Profil Bactériologique de la flore buccale des patients totalement edentés à la clinique dentaire de Blida. *Journal de la faculté de médecine de Blida*, 14-15.
- Bush, K. (2018).** Perspectives passées et présentes sur les β -lactamases. *Agents antimicrobiens et chimiothérapie*, 62(10), 10-1128.
- Chinnasamy, A., Ramalingam, K., Chopra, P., Gopinath, V., Bishnoi, G. P., & Chawla, G. (2019).** Chronic nail biting, orthodontic treatment and *Enterobacteriaceae* in the oral cavity. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 11(12), e1157.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985)** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010).** Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201. 6
- El Bousaadani, A., Eljahd, L., Abada, R., Rouadi, S., Roubal, M., & Mahtar, M. (2016).** Prevention and treatment of mucositis in children with oral cancers

Huang, R., Li, M. et Gregory, R. L. (2011). Interactions bactériennes dans le biofilm dentaire. *Virulence*, 2(5), 435-444.

Kaboré, W. A., Konaté, A., Boisramé, S., Traoré, A. S., Barro, N., & San Garé, L. (2016). Susceptibilité antimicrobienne des souches cliniques d'entérobactéries isolées d'infections bucco-dentaire à Ouagadougou, Burkina faco.

Labbate, M., Zhu, H., Thung, L., Bandara, R., Larsen, M. R., Willcox, M. D., ... & Kjelleberg, S. (2007). Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *Journal of bacteriology*, 189(7), 2702-2711.

Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews microbiology*, 16(12), 745-759.

Lê, S., Minty, M., Boyer, É., Blasco-Baque, V., Bonnaure-Mallet, M., & Meuric, V. (2024). hepatitis. *médecine/sciences*, 40, 42-8.

Liu, S., Chen, L., Wang, L., Zhou, B., Ye, D., Zheng, X., ... & Ye, J. (2022). Cluster differences in antibiotic resistance, biofilm formation, mobility, and virulence of clinical *Enterobacter cloacae* complex. *Frontiers in Microbiology*, 13, 814831

Marsh, 2006. La plaque dentaire en tant que biofilm et communauté microbienne - implications pour la santé et la maladie. *BMC Santé bucco-dentaire*, 6 (Suppl 1), S14.

Marsh, P. D., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology*, 44, S12-S22.

Matthew E, Falagasa A, Petros I. Rafailidis A, Dimitrios K. Matthaïoua. (2010). Résistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. 1368-7646.

Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Claude, J. D. P. G., & Timinouni, M. (2011). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie biologie*, 59(4), e73-e78.

Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887-902.

Miethke, M. et Marahiel, M. A. (2007). Acquisition de fer à base de sidérophore et contrôle des agents pathogènes. *Revue de microbiologie et de biologie moléculaire*, 71(3), 413-451.

Références bibliographiques

- Munford, R.S. (2008).** Détection des lipopolysaccharides bactériens à Gram négatif : un déterminant de la maladie humaine. *Infection et immunité*, 76(2), 454-465.
- Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43(1), 197-222.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R. et Livermore, D. M. (2011).** Les carbapénémases NDM émergentes. *Tendances en microbiologie*, 19(12), 588-595.
- OMS. (2018)** Rapport : Santé bucco-dentaire.
- Paju, S. et Scannapieco, F.A. (2007)** Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Journal of the American Dental Association*, 138 Suppl: 21S-31S.
- Pognon, S. A. B., Houinato, D. S., Djigbenoude, O., & Agueh, J. S. (2013).** Facteurs de risque communs aux maladies bucco-dentaires et aux maladies non transmissibles à Cotonou (Bénin). *Médecine buccale chirurgie buccale*, 19(3), 155-159.
- Pullen, L. C. (2018).** Lung allocation sequence: the system evolves. *American Journal of Transplantation*, 18(5), 1037-1038
- Rajakumari, M. L., & Kumari, P. S. (2015).** IJARQG (USA). *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 2(11), 304-311.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010).** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, 13(6), 151-171.
- Renoux, M., Pajot, T., & Radoï, L. (2016).** À propos d'un cas de nécrose osseuse mandibulaire: ostéite chronique suppurée ou ostéochimionécrose. *64ème Congrès de la SFCO*, 02014.
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2010).** Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(12), 1441-1450.
- SOUNA D. (2011).** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes. Mémoire de Magister en Biologie. Algérie: Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen; 126p.

Références bibliographiques

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... & Zorzet, A. (2018).** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet infectious diseases*, 18(3), 318-327. (amc/ pip / TIC = blse
- Tada, A. et Hanada, N. (2010).** Agents pathogènes respiratoires opportunistes dans la cavité buccale des personnes âgées. *FEMS Immunologie et microbiologie médicale*, 60(1), 1-17.
- Thanassi, D. G., Nuccio, S. P., Shu Kin So, S., & Bäumler, A. J. (2007).** Fimbriae: classification and biochemistry. *EcoSal Plus*, 2(2), 10-1128.
- Touati, A., Mairi, A., Baloul, Y., Lalaoui, R., Bakour, S., Thighilt, L., ... & Rolain, J. M. (2017).** First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 17-18.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., &Varaldo, P. E. (2014).** Antibioticresistancerelated to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3), 743-758
- Zaatout, N. (2021).** Presence of non-oral bacteria in the oral cavity. *Archives of microbiology*, 203(6), 2747-2760.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل هو أولاً تحديد مجموعة من السلالات البكتيرية سالبة الجرام التي تنتمي إلى مختبر أبحاث "المضادات الحيوية ومضادات الفطريات: الكيمياء الفيزيائية والتركيب والنشاط البيولوجي"، وثانياً دراسة خصائص مقاومتها للمضادات الحيوية وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية. كشفت نتائج تحديد الهوية عن (5) سلالات من بكتيريا *Enterobacter cloacae*، و(3) سلالات من بكتيريا *Klebsiella pneumoniae*، و(1) سلالة من بكتيريا *Klebsiella oxytoca*، و(1) سلالة من بكتيريا *Serratia marcescens*. وأظهر تحليل الأنماط الظاهرية للمقاومة وجود أنماط ظاهرية لمقاومة إنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL) وبيتا، وطيف ممتد الطيف المرتبط بإنزيم السيفالوسبوريناز (Case +ESBL). كشفت دراسة قدرة السلالات على تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة أن (9) سلالات صُنفت على أنها شديدة التكوين للأغشية الحيوية الرقيقة في المختبر.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا سالبة الجرام، بكتيريا سالبة الجرام، السيفالوسبوريناز الممتد الطيف بيتا لاكتاماز (ESBL)، السيفالوسبوريناز (Case)، الأغشية الحي

Résumé

Ce travail avait pour but d'identifier dans un premier temps une collection de souches de bactéries Gram négatives appartenant au laboratoire de recherche "Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique" et dans un second temps d'étudier leurs profils de résistance aux antibiotiques ainsi que leurs capacités à former des biofilms. Les résultats d'identification ont permis de mettre en évidence (5) souches d'*Enterobacter cloacae*, (3) souches de *Klebsiella pneumoniae*, (1) souche de *Klebsiella oxytoca* et (1) souche de *Serratia marcescens*. L'analyse des phénotypes de résistance a montré les phénotypes β -lactamase à spectre élargi (BLSE) et β -lactamase à spectre élargi associé à une céphalosporine (BLSE+ Case). L'étude de la capacité des souches à former des biofilms a révélé que (9) souches étaient catégorisées fortement formatrices de biofilms *in vitro*.

Mots clés : Bactéries Gram négatives, β -lactamase à spectre élargi (BLSE), céphalosporines (Case), biofilms.

Abstract

The aim of this work was firstly to identify a collection of Gram-negative bacterial strains belonging to the "Antibiotics, Antifungals: physico-chemistry, synthesis and biological activity" research laboratory and secondly to study their antibiotic resistance profiles and their ability to form biofilms. The identification results revealed (5) strains of *Enterobacter cloacae*, (3) strains of *Klebsiella pneumoniae*, (1) strain of *Klebsiella oxytoca* and (1) strain of *Serratia marcescens*. Analysis of the resistance phenotypes showed the β -lactamase extended spectrum (ESBL) and β -lactamase extended spectrum associated with a cephalosporinase (ESBL+ Case) phenotypes. Study of the ability of strains to form biofilms revealed that (9) strains were categorised as strongly biofilm-forming *in vitro*.

Key words: Gram-negative bacteria, extended-spectrum β -lactamase (ESBL), cephalosporinase (Case), biofilms