

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université A /MIRA de Béjaia**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de microbiologie**

## **Mémoire De Magister**

**Option :**

**Microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes**

### **Thème**

**Caractérisation phénotypique des mécanismes de  
résistance aux antibiotiques chez des bacilles à  
Gram négatif isolés en médecine de ville**

**Présenté par : Mlle MEZHOUD Halima**

**Devant le jury :**

<b>Président : Dr. ZAIDI F.</b>	<b>MCA</b>	<b>(UAMB)</b>
<b>Promoteur : Dr. Touati A.</b>	<b>MCA</b>	<b>(UAMB)</b>
<b>Co promoteur : Dr Ait Bachir</b>	<b>Pharmacien biologiste</b>	
<b>Examineur 1: Dr. BEDJOU F.</b>	<b>MCA</b>	<b>(UAMB)</b>
<b>Examineur 2: Dr. KECHA M.</b>	<b>MCA</b>	<b>(UAMB)</b>

**2011**

## DÉDICACES

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents*

*Mes frères et mon beau frère*

*Mes sœurs et belles sœurs*

*Mes neveux Samy, Bilal et Asma*

*Toute ma famille*

*Tous mes amis (es)*

*Et toute la promotion de la PG 2009 microbiologie*

## **Remerciements**

**« Louange à Allah pour m'avoir donnée le courage pour réaliser ce travail »**

***Je tiens à remercier tout d'abord tous mes enseignants, du primaire jusqu'à la post graduation.***

*Je remercie mon promoteur Dr. Touati, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, et mon co-promoteur Dr Ait Bachir, Pharmacien biologiste, pour m'avoir encadrée, formée, dirigée et surtout pour m'avoir fait confiance. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.*

*J'adresse mes remerciements aussi à :*

*Docteur Zaidi. F, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*Madame la doctoresse Bedjou. F, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, et Docteur Kecha. M, Maitre de conférences de l'université de Béjaïa, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à l'égard de Dr Djama qui m'a accueillie dans son laboratoire ainsi que Dr Ait Bachir.*

*Je tiens également à remercier tout le personnel des deux laboratoires (Ait Bachir et Djama).*

*Bien sûr je n'oublie pas toute l'équipe du laboratoire.*

***Un remerciement spécial pour Mounia ARAB.***

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction.....1**

## **Chapitre I : Synthèse biobibliographique**

<b>I. Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Généralités.....</b>	<b>2</b>
<b>I.2. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1. Inactivation des antibiotiques .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.2. Altération de la cible.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.3. Prévention de l'accès des antibiotiques à la cible.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3. Mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.1. Plasmides.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3.2. Transposons.....</b>	<b>9</b>
<b>I.3.3. Intégrons.....</b>	<b>9</b>
<b>I.4. Mécanismes de transfert génétique de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>10</b>
<b>I.4.1. Conjugaison.....</b>	<b>10</b>
<b>I.4.2. Transduction.....</b>	<b>10</b>
<b>I.4.3. Transformation .....</b>	<b>11</b>
<b>II. Nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>11</b>
<b>II.1. Nouveaux mécanismes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>11</b>
<b>II.1.1. Céphalosporinases .....</b>	<b>12</b>
<b><i>II.2.3.1 AmpC chromosomique.....</i></b>	<b>12</b>
<b><i>II.2.3.2. AmpC plasmidique .....</i></b>	<b>13</b>
<b>II.1.2. BLSE .....</b>	<b>13</b>
<b>II.1.3. Carbapénèmases .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.3.1. Carbapénèmases de Classe A .....</b>	<b>22</b>
<b>II.1.3.2. Carbapénèmases de Classe D .....</b>	<b>25</b>

II.1.3.3. Carbapénèmases de Classe B .....	25
II.2. Nouveaux mécanismes de résistance aux quinolones .....	26
II.2.1. Généralités .....	26
II.2.2. Résistance plasmidique .....	27
II.3. Nouveaux mécanismes de résistance aux aminosides .....	32
II.3.1. Généralités.....	32
II .3.2. Résistance plasmidique aux aminosides .....	32

## Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Prélèvements .....	36
2. Isolement.....	36
3. Identification.....	36
4. Etude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques .....	39
4.1. <i>Antibiogramme standard</i> .....	39
4.2. <i>DD-TEST (ou test de synergie)</i> .....	42
4.3. <i>DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline</i> .....	43
4.4. <i>Recherche de la production de métallob<math>\beta</math>-lactamases (M<math>\beta</math>L)</i> .....	43
5. Conjugaison et transfert de la résistance .....	44
6. Détermination des CMI en milieu solide .....	46
6.1. <i>Détermination des CMI pour les souches d'entérobactéries sensibles à la céfoxitine</i> .....	46
6.2. <i>Détermination des CMI pour les souches d'entérobactéries résistantes à la céfoxitine</i> .....	48
6. 3. <i>Détermination des CMI pour les souches d'Acinetobacter baumannii</i> .....	49
7. Traitement statistique des données.....	49

## Chapitre III: Résultats et discussion

<b>I. Recueil de souches de bacilles à Gram négatif</b>	<b>50</b>
I.1. Répartition des souches par espèces	51
I.2. Caractéristiques de la population	53
<b>II. Résistance aux antibiotiques chez les <i>Enterobacteriaceae</i>.</b>	<b>56</b>
II.1. Résistance aux quinolones	57
II.1.1. Caractéristiques de la population	58
II.1.2. Répartition des souches <i>Nal R</i> par type de prélèvement	62
II.1.3. Répartition des souches <i>Nal R</i> par espèces	63
II.1.4. Phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones	64
II.1.5. CMI des souches d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine	66
II.2. Résistance aux $\beta$ -lactamines	71
2.1. Résistance aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération (C3G)	71
2.1.1. Caractéristiques de la population	72
2.1.2. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèces	75
2.2. Résistance aux céphalosporines de 4 <sup>ème</sup> génération (C4G)	76
2.3. Résistances aux autres $\beta$ -lactamines	77
2.4. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	78
2.4.1. DD-test	78
2.4.2. DD-test sur <i>MH</i> à la cloxacilline	81
2.4.3. Prévalence des <i>BLSE</i>	82
2.4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	83
2.4.5. Prévalence des céphalosporinases	87
2.4.6. Prévalence de l'imperméabilité membranaire	87
2.5. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	87
2.5.1. Phénotype de résistance chez <i>E.coli</i>	87
2.5.2. Phénotype de résistance chez <i>Klebsiella sp</i>	94

2 .5.3. <i>Phénotype de résistance chez Citrobacter sp</i> .....	99
2 .5.4. <i>Phénotype de résistance chez Proteus sp</i> .....	100
2 .5.5. <i>Phénotype de résistance chez M. morganii</i> .....	100
<b>II. 3. Résistance aux aminosides</b> .....	<b>101</b>
<b>II. 4. Transfert de la résistance chez les entérobactéries</b> .....	<b>106</b>
<b>III. Résistance chez les souches d'Acinetobacter baumannii</b> .....	<b>110</b>
<b>IV. Résistance des souches de Pseudomonas aeruginosa</b> .....	<b>112</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>114</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>116</b>

## Liste des abréviations

AA: Acide Aminé

BLSE: B-lactamase à spectre élargie

BMR : Bactérie multirésistantes.

C1G: Céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération

C2G: Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération

C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

C4G: Céphalosporine de 4<sup>ème</sup> génération

CMI: Concentration minimale inhibitrice

EDTA : Ethylène diamine tétra acétate.

FQ : fluoroquinolones.

MBL : Métallo B-lactamase

MH : Mueller Hinton.

Nal: acide nalidixique

ORF: Open Reading Framework (Cadre ouvert de lecture)

PLP : Protéines liant les pénicillines

PMQR : Plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones

*Qep* : Quinolones efflux pompe

*Qnr* : Quinolones résistance

QRDR: quinolone-resistance determining region

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la méthicilline.

TRI : TEM (Temoniéra) Résistant aux inhibiteurs.

ITU : infection de tractus urinaire

PA β N : phénylalanine Arginine-β-Naphtylamide



N°	TITRE	P
I.	Modes d'action des antibiotiques	3
II.	Familles majeures des plasmides et des gènes associés à la résistance des souches d'entérobactéries	8
III.	Comparaison de la classification des $\beta$ -lactamases de Bush Jacoby-Medieors 1995 et celle de Buch et Jacoby 2009	14
IV.	Différentes classes des carbapénèmases avec leurs profils d'hydrolyse et d'inhibition	22
V.	Liste standard des antibiotiques à tester pour les bacilles à Gram négatif	40
VI.	Liste complémentaire des antibiotiques à tester pour les bacilles à Gram négatif	41
VII.	Répartition de la population selon l'âge	53
VIII.	Significativité par case	55
IX.	Répartition des souches d'entérobactéries par catégories d'âge	56
X.	Comparaison des taux de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries	58
XI.	Répartition de la population par catégories d'âge	58
XII.	Proportion des souches d'entérobactéries Nal R par sexe	60
XIII.	Significativité par case	62
XIV.	Répartition des souches Nal R par type de prélèvement	62
XV.	Répartition des souches d'entérobactéries Nal R par espèces	63
XVI.	Comparaison des taux de résistance aux quinolones par espèces	64
XVII.	Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones	64
XVIII.	Prévalence des phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones	65
XIX.	Répartition des phénotypes de résistance aux quinolones par espèces	66
XX.	CMI des souches d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine	68
XXI.	Diamètres et profils de résistance au CTX et CAZ	71
XXII.	Taux de résistance aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération par sexe	72
XXIII.	Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âge...	73
XXIV.	Significativité par case	73
XXV.	Significativité par case	74
XXVI.	Répartition des souches résistantes aux C3G par espèces	75
XXVII.	Significativité par case	75
XXVIII.	Comparaison des taux de résistance aux C3G avec d'autres taux rapportés par la littérature	77
XXIX.	Taux de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries par espèces	78
XXX.	Profil de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G	79
XXXI.	Diamètres des antibiotiques sur gélose MH à la cloxacilline	81
XXXII.	Prévalence des BLSE chez les entérobactéries résistantes aux C3G	82
XXXIII.	Significativité par case	83
XXXIV.	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices aux $\beta$ -lactamines	84
XXXV.	Interprétation des concentrations minimales inhibitrices en S/I/R	85
XXXVI.	Comparaison des taux de résistance des souches d' <i>E.coli</i> obtenus par notre étude avec les autres études	88
XXXVII.	Phénotypes de résistance d' <i>E.coli</i> aux $\beta$ -lactamines	88
XXXVIII.	Critères de détermination des types de BLSE	91
XXXIX.	Types de BLSE	92

<b>XL.</b>	Comparaison des taux de résistance des souches de <i>Klebsiella sp.</i> obtenus par notre étude avec les autres études	95
<b>XLI.</b>	Type de BLSE produites pas les souches de <i>Klebsiella sp</i> ainsi que les phénotypes probables	98
<b>XLII.</b>	Comparaison des taux de résistance, aux aminosides, des souches d' <i>E.coli</i> de <i>Klebsiella sp.</i> obtenus par notre étude avec les autres études	102
<b>XLIII.</b>	Caractéristiques des souches d'entérobactéries résistantes à la gentamicine.	103
<b>XLIV.</b>	Caractères des souches multi résistantes	105
<b>XLV.</b>	Caractéristiques des souches utilisées pour la conjugaison bactérienne.	106
<b>XLVI.</b>	Profils de résistances des transconjugants.	107
<b>XLVII.</b>	Résultats des CMI des transconjugants et leurs souches donatrices	107
<b>XLVIII.</b>	Profil de résistance des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux $\beta$ -lactamines	110
<b>XLIX.</b>	Profil de résistance des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux quinolones, aminosides et à la colistine.	111
<b>L.</b>	Résultats des CMI obtenues pour les souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à l'IMP.	111

N°	TITRE	P
1.	Phylogénie des $\beta$ -lactamases chromosomiques de <i>Kluyvera sp</i> et des CTX-M. La CTX-M-64 est une CTX-M hybride entre CTX-M-14 et CTX-M-15	16
2.	Antibiogramme en diffusion de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> YC portant le gène <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	24
3.	Comparaison des séquences des plasmides médiateurs des déterminants QnrA, QnrB et QnrS	29
4.	Structure de l'intégron contenant le gène <i>qnr A1</i> des Etats Unis	30
5.	Structure secondaire prédite de QepA	31
6.	Dendrogramme des méthylases de l'ARNr 16S des bactéries à Gram négatif et des actinomycètes	33
7.	Disposition des disques d'antibiotiques	42
8.	DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline.	43
9.	Technique de la recherche des M $\beta$ L	44
10.	Technique de la détermination des CMI sur milieu solide.	47
11.	Répartition des souches de bacilles à Gram négatif isolées des laboratoires d'analyses médicales privés	50
12.	Répartition des souches de bacilles à Gram négatif isolées par espèces.	51
13.	Répartition de la population selon le sexe	52
14.	Répartition des souches selon l'âge des patients	53
15.	Répartition de la population selon l'âge et le sexe	54
16.	Proportions de résistance aux quinolones	57
17.	a . Taux de souches d'entérobactéries Nal R par catégories d'âge.	59
17.	b . Taux d'infections par les entérobactéries par catégories d'âge.	59
18.	Proportion des souches d'entérobactéries Nal R par sexe	60
19.	Pyramide des âges chez les sexes masculin et féminin.	61
20.	Phénotypes de résistance aux quinolones	65
21.	Pyramide des âges du sexe masculin et du sexe féminin	74
22.	Taux de résistance aux C4G	76
23.	Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches d' <i>E.coli</i>	89
24.	Taux de résistance des souches de <i>Klebsiella sp</i> aux $\beta$ -lactamines.	94
25.	Antibiogramme de la souche HD51 ainsi que le mutant	96
26.	Antibiogramme de la souche HD12.	99
27.	Taux de résistance des souches de <i>Proteus sp.</i> aux $\beta$ -lactamines.	100
28.	Taux de résistance aux aminosides chez les entérobactéries	101
29.	Comparaison du DD-test effectué pour les transconjugants et leurs souches donatrices	108
30.	DD-test effectué pour les transconjugants THD27 et THD51.	109

De la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970, nombreuses molécules d'antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique ont été découvertes. Le succès des premiers traitements anti-infectieux a fait considérer le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances aux antibiotiques. A chaque nouvelle molécule introduite, les bactéries se sont adaptées et résistées plus ou moins vite. Apparaissant aujourd'hui de véritables « monstres » bactériens à tous les antibiotiques potentiellement actifs (Ploy et *al.*, 2005).

En effet, certaines souches sont devenues résistantes presque à tous les antibiotiques disponibles. Le cas le plus célèbre est celui du SARM qui résiste non seulement à la méthicilline mais généralement aussi aux aminosides, les macrolides, les tétracyclines, le chloramphénicol et aux lincosamides (Nikaido, 2009).

En plus du SARM, il y a eu l'émergence de certains agents pathogènes à Gram négatif, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, et les *Enterobacteriaceae*. Au cours de ces dernières années, la fréquence et l'ampleur des infections causées par les bacilles à Gram négatif, résistants aux antibiotiques, ont augmenté tant en milieu hospitalier qu'en communautaire à cause de l'utilisation abusive et non surveillée des antibiotiques.

De récentes études ont révélé l'émergence des micro-organismes producteurs de BLSE en communautaire dans plusieurs régions du monde (Pitout et *al.*, 2005). Les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargie (EBLSE), apparues à la fin de 1980 en médecine hospitalière, ont actuellement émergé en médecine communautaire (Arpin et *al.*, 2005) et le plus souvent associées à la résistance à d'autres molécules d'antibiotiques tels que les quinolones et les aminosides (Pitout et *al.*, 2005).

Les bactéries multirésistantes constituent désormais un problème majeur de santé publique. Plusieurs mécanismes sont à la base de cette multirésistance aux antibiotiques. L'hydrolyse enzymatique reste cependant le mécanisme prépondérant et en particulier la production de  $\beta$ -lactamases. Les plus importantes de ces dernières sont les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* conférant la résistance aux céphalosporines de troisième génération et à l'aztréonam. L'association de multiples mécanismes de résistance (efflux, imperméabilité, inactivation enzymatique) crée à son tour des bactéries multirésistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* BMR et *Acinetobacter baumannii* BMR. Alors qu'elles étaient limitées à l'environnement hospitalier, ces bactéries multirésistantes sont devenues un problème majeur d'infections communautaires touchant des personnes ayant peu ou pas de contact avec l'environnement hospitalier (Hamouche et Sarkis, 2011).

C'est dans le but de caractériser les profils de résistance aux antibiotiques émergents en communautaire, la surveillance de la résistance des bacilles à Gram négatif impliqués dans les infections en médecine de ville, et de diriger les traitements probabilistes effectués en cas d'urgence que notre étude est entreprise. Pour ce faire, nous avons adopté le plan suivant :

- ☞ Collection de souches de bacilles à Gram négatif de deux laboratoires d'analyses médicales de la wilaya de Béjaïa ainsi que les données concernant les patients ;
- ☞ Détermination des profils de résistance aux différentes familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, quinolones, aminosides et autres) ;
- ☞ Etude du transfert des gènes codants pour la résistance aux antibiotiques ;
- ☞ Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les souches résistantes aux trois familles d'antibiotiques ainsi que pour les transconjugants obtenus ;
- ☞ Caractérisation des phénotypes de résistance les plus probables ;
- ☞ Evaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en médecine de ville ;
- ☞ Et en enfin, la détermination de quelques facteurs de risque dans l'acquisition de souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux antibiotiques.

## I. Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques

### I.1. Généralités

La découverte de la pénicilline en 1928 a été suivie par la découverte et la production commerciale de nombreux autres antibiotiques (Nikaido, 2009). Les agents antimicrobiens utilisés pour le traitement des infections bactériennes doivent être groupés selon leurs modes d'action. Les principaux modes d'action des antibiotiques sont résumés dans le tableau I.

**Tableau I : Modes d'action des antibiotiques (Tenover, 2006) :**

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Inhibition de la synthèse de la paroi :</b><ul style="list-style-type: none"><li>☞ <math>\beta</math>-lactamines ;</li><li>☞ Glycopeptides ;</li></ul></li><li>• <b>Inhibition de la synthèse des protéines :</b><ul style="list-style-type: none"><li>☞ Liaison à la sous unité 50S : macrolides, chloramphénicol;</li><li>☞ Liaison à la sous unité 30S : aminosides, tetracyclines ;</li><li>☞ Liaison à l'isoleucyl-ARNt synthétase : mupirocine ;</li></ul></li><li>• <b>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques :</b><ul style="list-style-type: none"><li>☞ Inhibition de la synthèse d'ADN : fluoroquinolones ;</li><li>☞ Inhibition de la synthèse de l'ARN : rifampicine ;</li></ul></li><li>• <b>Inhibition des voies métaboliques :</b> analogues de l'acide folique, sulfonamides;</li><li>• <b>Perturbation de la structure membranaire :</b> polymyxines, daptomycine.</li></ul>
--

Les bactéries peuvent manifester une résistance aux antibiotiques par plusieurs mécanismes. Certaines espèces sont naturellement résistantes à un antibiotique au minimum. Dans tels cas, toutes les souches de cette espèce bactérienne sont également résistantes à tous les membres de la famille de cet antibiotique (Ploy et *al.*, 2005). D'autres espèces, ont été initialement sensibles aux antibiotiques puis elles sont devenues résistantes, c'est la résistance acquise. Cette résistance est due à l'acquisition d'un plasmide ou d'un transposon qui contient les déterminants de la résistance ou à des mutations au niveau du chromosome (Tenover, 2006 ; Yoneyama et Katsumata, 2006).

## I.2. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

Les principaux mécanismes de la résistance aux antibiotiques sont : l'inactivation des antibiotiques ; l'altération de la cible et la prévention de l'accès des antibiotiques à la cible.

### I.2.1. Inactivation des antibiotiques

L'inactivation enzymatique des antibiotiques, que ce soit par hydrolysis or by modification is a major mechanism of hydrolyse ou par modification, est un mécanisme de résistance important resistance in pathogenic bacteria to natural antibiotics des bactéries pathogènes aux antibiotiques naturels such as  $\beta$ -lactams (penicillins and cephalosporins), comme les  $\beta$ -lactamines (pénicillines et céphalosporines), les aminoglycosides, and chloramphenicol. aminosides, et au chloramphénicol (Yoneyama et Katsumata, 2006).

Le mécanisme de résistance le plus important aux  $\beta$ -lactamines, chez les bactéries à Gram négatif, est la production de  $\beta$ -lactamases. Ces enzymes inactivent ces molécules par hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactam (Bassetti et al., 2008).

La stratégie d'inactivation des aminosides consiste à modifier d'une manière covalente les groupements OH et NH<sub>2</sub> de ces antibiotiques (Yoneyama et Katsumata, 2006). Il existe trois types d'enzymes modifiant les aminosides ; ces enzymes peuvent soit phosphoryler ces antibiotiques par des aminosides phosphoryltransférases (APH), soit les acétyler par des aminosides acétyltransférases (AAC) ou les adényler par des aminosides adényltransférases ou des nucleotidyltransférases (McDermontt et al., 2003 ; Nikaido, 2009).

La résistance au chloramphénicol est souvent conférée par des chloramphénicol acétyltransférases (CAT) et plusieurs gènes *cat* ont été identifiés chez plusieurs genres bactériens (McDermontt et al., 2003). Elles inactivent cet antibiotique par transfert du groupement acétyle à partir de l'acétyl-CoA. Cette inactivation diminue considérablement l'affinité de l'antibiotique pour l'ARNr (Yoneyama et Katsumata, 2006).

### I.2.2. Altération de la cible

#### ➤ *Modification mutationnelle de la cible*

Les bactéries peuvent acquérir des résistances aux antibiotiques par des mutations ponctuelles au niveau de la cible ; ces mutations affectent l'affinité de la cible pour l'antibiotique. Ce mécanisme de résistance est le mécanisme principal, mais pas l'unique, de la résistance aux fluoroquinolones. Les mutations affectent les ADN topoisomérases, cibles

de ces antibiotiques. La résistance de haut niveau aux fluoroquinolones est attribuée, principalement, à des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* (McDermontt et al., 2003; Yoneyama et Katsumata, 2006).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines est due, non seulement à la production de  $\beta$ -lactamases, mais aussi à l'altération de la cible PLP (Protéine Liant Pénicilline) par mutation ou acquisition d'une nouvelle PLP de faible affinité pour ces antibiotiques (Yoneyama et Katsumata, 2006).

➤ **Acquisition d'une nouvelle cible<sup>35,36</sup>The classic**

La résistance à l'oxacilline ou à la méthicilline, des souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline(SARM), est associée à l'acquisition de l'élément génétique nommé SCC*mec* qui porte le gène de la résistance *mecA*. Ce déterminant code pour une nouvelle protéine liant la pénicilline, PLP2a dont l'expression est souvent induite par la méthicilline ou une autre  $\beta$ -lactamine. Cette nouvelle cible possède une faible affinité pour l'oxacilline et la plupart des autres  $\beta$ -lactamines (Tenover, 2006 ; Nikaido, 2009).

➤ **Contournement de la cible**

Un autre exemple d'altération de la cible est observé chez les souches d'Entérocoques résistantes à la vancomycine(ERV). Cinq phénotypes de résistance ont été identifiés à ce jour, VanA, VanB, VanC, VanD et VanE. Les phénotypes VanA, VanB, VanD et VanE sont des phénotypes de résistance acquises ; VanC est un phénotype de résistance intrinsèque (Yoneyama et Katsumata, 2006).

L'étude du mécanisme de résistance a montré que la fin du pentapeptide « D-Ala-D-Ala », site de fixation de la vancomycine, a été remplacée chez les souches résistantes par une structure d'ester D-Ala-D-lac (McDermontt et al., 2003; Yoneyama et Katsumata, 2006). Cette modification diminue l'affinité de la cible pour la vancomycine ce qui permet à la cellule de continuer sa croissance en présence de cet antibiotique (Nikaido, 2009).

### **I.2.3. Prévention de l'accès des antibiotiques à la cible**

L'accès des antibiotiques à la cible peut être réduit localement comme il peut être également réduit par un processus d'efflux actif (Nikaido, 2009). Chez les bactéries à Gram négatif, l'empêchement de l'accès des antibiotiques à leurs cibles résulte aussi de la diminution de l'afflux des antibiotiques à travers les membranes biologiques (Yoneyama et Katsumata, 2006 ; Nikaido, 2009).



➤ **Protection de cible**

Les protéines Tet(M) ou Tet(S), produites par des gènes plasmidiques chez les bactéries à Gram positif, se lient aux ribosomes avec une haute affinité et apparemment change leur conformation. Ce changement conformationnel du ribosome empêche l'association des tétracyclines. Les protéines Qnr qui sont devenues plus fréquentes ces dernières années, semblent protéger les ADN topoisomérases, de la même manière, des (fluo) quinolones (Nikaido, 2009).

➤ **Efflux actif**

La résistance aux antibiotiques en raison du système d'efflux actif a été découverte avec la protéine Tet(A) de la résistance à la tétracycline, chez les bactéries à Gram négatif. Cette protéine catalyse un pompage actif vers l'extérieur d'un complexe Magnizium-tétracycline (Nikaido, 2009). Le système d'efflux est présent aussi bien chez les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. Chez ces dernières, il est plus complexe à cause de l'architecture moléculaire de l'enveloppe cellulaire (Kumar et Schweizer, 2005). L'exemple type de ce mécanisme de résistance est *Pseudomonas aeruginosa*. Une mutation, entraînant l'hyperexpression de la pompe d'efflux MexAB-OprM, rend ces micro-organismes résistants à une grande variété d'antibiotiques. Etant donné que la perte de la pompe d'efflux MexAB-OprM, par mutation, cause une hypersensibilité envers plusieurs antibiotiques, alors la résistance intrinsèque de ces micro-organismes est apparemment due à l'efflux actif (Yoneyama et Katsumata, 2006).

➤ **Imperméabilité membranaire**

Pour accéder à leurs cibles, les antibiotiques doivent traverser l'enveloppe cellulaire. Chez les bactéries à Gram négatif, la plupart des fluoroquinolones traverse la membrane externe par des porines bien que d'autres peuvent diffuser directement à travers la bicouche phospholipidique. La résistance due à l'imperméabilité des molécules d'antibiotiques est généralement une résistance de bas niveau. Par exemple, les mutations de la porine OmpF d'*E.coli* a montré une augmentation de la résistance aux quinolones (McDermontt et al., 2003).

Les  $\beta$ -lactamines sélectionnent, in vitro sur les milieux riches, des mutants déficients de porines de la membrane externe OprD2 ; ces mutants deviennent résistants aux carbapénèmes à cause de l'inaccessibilité de ces agents à leur cible, protéine liant la

pénicilline (PLP) (Yoneyama et Katsumata, 2006 ; Strateva et Yordanov, 2009). Plusieurs souches de *P. aeruginosa* sont également caractérisées résistantes par un déficit en cette protéine (Strateva et Yordanov, 2009).

### **I.3. Mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques**

Les gènes codants pour les déterminants de la résistance aux antibiotiques peuvent être situés soit sur le chromosome et dans ce cas là, la résistance est transmise verticalement aux cellules filles ; soit ils peuvent être transmis horizontalement par des éléments d'ADN mobiles tels que les plasmides et les transposons (Ploy et *al.*, 2005).

Certains gènes de résistance aux antibiotiques ne sont généralement pas transmissibles entre les cellules en raison de leur localisation chromosomique, telle que la résistance aux fluoroquinolones. La résistance de haut niveau à ces agents est associée à des mutations dans les gènes de la topoisomérase. Ces gènes sont considérés comme des gènes « domestiques » localisés sur le chromosome et communs à toutes les bactéries. Les gènes de résistance, d'importance clinique, résident habituellement sur des éléments mobiles d'ADN, dont certains peuvent se propager à plusieurs espèces bactériennes non liées (McDermontt et *al.*, 2003).

#### **I.3.1. Plasmides**

Les plasmides sont des petits fragments d'ADN doubles brins, circulaires et cytoplasmiques, capables de répllication autonome. Leur transmission naturelle entre bactéries s'effectue habituellement par conjugaison. Ils ont été découverts au Japon à la fin de 1950 à la suite de la constatation de l'existence simultanée dans les selles de malades, de souches d'*E.coli* et de *Shigella dysenteriae* corésistantes à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et aux sulfamides (Skurnik, 2009).

Les familles majeures des plasmides et des gènes associés à la résistance des souches d'entérobactéries, isolées dans le monde, des différentes sources humaines et animales, sont résumées dans le tableau II.

Tableau II : Familles majeures des plasmides et des gènes associés à la résistance des souches d'entérobactéries (Crattoli, 2009).

Réplicon	Numéro du plasmide	Gènes de résistance	Espèces
F	331	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>bla<sub>CMY-2</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-1-2-3-9-14-15-24-27</sub></i> , <i>bla<sub>DHA-1</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-2-5-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>armA</i> , <i>rmtB</i> , <i>qepA</i> , <i>qepA2</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB6</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i> <i>S. sonnei</i>
A/C	317	<i>bla<sub>CMY-2-4</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-2-3-14-15-56</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-2-5-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-3-21-24</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-4-8-13</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-4</sub></i> , <i>bla<sub>VEB-1</sub></i> , <i>armA</i> , <i>rmtB</i> , <i>qnrA1</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i>
I/M	270	<i>aac(6<sub>-</sub>)-Ib-cr</i> , <i>bla<sub>CTX-M-1-3-15-42</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-3-10</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-5</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-4-8</sub></i> , <i>armA</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrB1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qnrS1</i>	<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. marcescens</i>
II	146	<i>bla<sub>CMY-2-7-21</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-1-2-3-9-14-15-24</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1-3-52</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>armA</i> , <i>rmtB</i> , <i>mphA</i> , <i>qnrA1</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. sonnei</i>
HI2	90	<i>bla<sub>CTX-M-2-3-9-14</sub></i> , <i>bla<sub>SHV-12</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-4</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>armA</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrS1</i>	<i>C. youngae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
N	70	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-1-3-15-32-40</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>qnrA3</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i> , <i>armA</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. ascorbata</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>

Le plasmide peut être constitué des autres éléments mobiles tels que les transposons et les intégrons (McDermontt et *al.*, 2003).

### I.3.2. Transposons

Les transposons sont des fragments d'ADN qui peuvent être mobilisés d'un site à un autre dans l'ADN de la cellule bactérienne (chromosomique ou plasmidique). Les gènes de la transposase, requise pour les mouvements, sont contenus dans le transposon. On décrit trois principaux types de transposons dont la forme la plus simple est la séquence d'insertion (IS). Elle ne contient que les gènes nécessaires à la transposition, elle varie entre 700 et 7500 pb et flanquée par deux séquences inversées et répétées (IR), indispensables à la transposition. Un essor du modèle (IS) est vu dans les transposons composites. Les transposons composites sont constitués d'une région centrale contenant des gènes autres que ceux qui sont nécessaires à la transposition, flanquée des deux cotés par des séquences d'insertion identiques ou très similaires dans l'ordre et dont l'orientation est habituellement inversée. Un nombre large de certains déterminants de résistance, dans de nombreuses espèces bactériennes, est transmis par les transposons composites. Toutefois, ce type de transposons ne comporte en règle qu'un ou deux gènes de résistance tels que *Tn9*, *Tn10*, *Tn903* et *Tn1546* et rarement plus (trois chez *Tn5*). Enfin, les transposons non composites contiennent, outre des IR, d'autres éléments, principalement un site de recombinaison et des gènes tels que les résolvases, de transposases ou des gènes de résistance (Skurnik, 2009).

### I.3.3. Intégrons

L'ampleur du développement de la résistance aux antibiotiques est aussi expliquée par la découverte d'un système génétique appelé « intégrons ». Ces derniers sont des éléments d'ADN avec une structure spécifique composée de deux segments conservés flanquant une région centrale dans laquelle les gènes cassettes de la résistance aux antibiotiques sont insérés. Plusieurs gènes cassettes, disposés en tandem, peuvent se présenter et plus de 70 cassettes différentes ont été identifiés. Les gènes cassettes associés peuvent conférer une résistance aux  $\beta$ -lactamines, les aminosides, au triméthoprim, au chloroforme, à la streptomycine, et aux composés d'Ammonium Quaternaire (McDermontt et *al.*, 2003 ; Ploy et *al.*, 2005).

L'intégron lui-même est une structure immobile, portée par des plasmides, des transposons, ou plus rarement par le chromosome bactérien. L'unité fonctionnelle d'un intégron est constituée d'un gène *IntI*, codant pour une intégrase, du site spécifique *attI*, qui

est un site spécifique de recombinaison et d'un promoteur Pc. Le gène *IntI*, code une intégrase qui une recombinase spécifique de site. Plusieurs classes d'intégrons ont été définies en fonction de la nature de l'intégrase (Ploy et al., 2005).

Il existe cinq classes possédant des cassettes contenant des gènes de résistance aux antibiotiques. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 sont bien caractérisés et reconnus comme étant impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Chez les intégrons de classe 1, l'intégrase *IntI1* est une protéine de 337 AA. Chez les intégrons de classe 2, le gène *IntI2* est interrompu par un codon stop précoce et code pour une intégrase de 170 AA ayant 46% d'homologie avec *IntI1* et qui est tronquée dans sa partie terminal. L'intégrase *IntI3* des intégrons de la classe 3 présente 61% d'homologie avec *IntI1* (Ploy et al., 2005).

Les intégrons présentent une situation particulièrement intéressante, car les déterminants de la résistance sont souvent sous le contrôle d'un seul promoteur. Par conséquent, ces déterminants sont co-exprimés et la pression sélective exercée par un agent antimicrobien va maintenir le phénotype de co-résistance conféré par les gènes adjacents (Skurnik, 2009).

#### **I.4. Mécanismes de transfert génétique de la résistance aux antibiotiques**

Actuellement, il existe trois mécanismes généraux d'échange génétique : la conjugaison, la transduction et la transformation (Kazimierczak et Scott, 2007).

##### **I.4.1. Conjugaison**

Elle peut se produire entre des espèces bactériennes liées ou non liées. Dans ce processus, les plasmides sont transférés à de nouvelles souches par l'intermédiaire des pilis de surface. Ce transfert nécessite un contact intime entre les cellules donatrices et réceptrices. Certains éléments transposables spécialisés peuvent également se propager de cette façon (McDermontt et al., 2003 ; Kazimierczak et Scott, 2007).

##### **I.4.2. Transduction**

La transduction est le deuxième mécanisme d'échange. Elle se produit par des bactériophages qui s'insèrent dans le génome de l'hôte durant la réplication de l'ADN. En sortant, ils peuvent prendre des pièces d'ADN de l'hôte et de les transférer à des hôtes ultérieures. Par hasard, certains de ces fragments d'ADN de l'hôte contiennent des déterminants de la résistance (McDermontt et al., 2003).

### I.4.3. Transformation

Enfin, la cellule peut prendre l'ADN libre dans son environnement proche par un processus appelé transformation. Chez les isolats cliniques, la part de lion de la résistance semble être plasmidique. L'importance de la transduction dans la génération des souches multi résistantes est certaine alors qu'il est difficile d'évaluer la contribution de la transformation dans l'évolution de la résistance aux antibiotiques, mais sa démonstration au laboratoire indique un rôle théorique. Néanmoins, ces mécanismes, pris ensembles, fournissent un passage adéquat pour les éléments mobiles d'ADN pour se propager facilement parmi des genres éloignés, et de causer l'émergence et la dissémination rapide de la multi résistance que nous avons observée chez de nombreuses bactéries pathogènes (McDermontt et *al.*, 2003).

## II. Nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

### II.1. Nouveaux mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont les agents antimicrobiens les plus utilisés en pratique clinique (Bassetti et *al.*, 2008). Cette famille regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames (Cavallo et *al.*, 2004). Les carbapénèmes sont les membres les plus puissants de cette famille ; c'est pour cette raison qu'ils sont réservés typiquement pour l'hôpital (Nicolau, 2008). Ils ont un spectre d'activité à l'égard des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif y compris les anaérobies (Rasmussen et Høiby, 2007).

Ces molécules, comme les autres  $\beta$ -lactamines, se lient et inactivent les PLP (Rasmussen et Høiby, 2007), responsables de l'élongation et de la liaison du peptidoglycane de la paroi bactérienne. L'activité de ces antibiotiques tend à être rapide et bactéricide. Contrairement à la plupart des antibiotiques, les carbapénèmes sont efficaces à l'égard de la majorité des bactéries cliniques à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter spp.* et des bactéries anaérobies (Nicolau, 2008).

La résistance aux carbapénèmes est actuellement rare au sein des souches d'entérobactéries, mais certaines résistances ont apparues ces dernières années (Paterson, 2006). Les entérobactéries peuvent résister à ces antibiotiques par deux principaux mécanismes :

➤ La production d'une céphalosporinase ou d'une BLSE associée à la diminution de la perméabilité par perte ou altération de porines ;

➤ La production de  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes nommées les carbapénémases (Cuzon et *al.*, 2010).

### II.1.1. Céphalosporinases

Ce sont les céphalosporinases de type AmpC. Elles sont habituellement non inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique ou le tazobactam (Manchanda et Singh, 2003). Cependant, *Morganella morganii* possède une variante d'AmpC qui peut être inhibée par le tazobactam (Denton, 2007). Leur spectre d'hydrolyse comprend les aminopénicillines, les C1G, et selon la nature de l'enzyme les C2G dont les céphamycines. L'AmpC hydrolyse dans une moindre mesure les carboxypénicillines, les ureidopénicillines et les C3G. Les enzymes hyperproduites pourraient inactiver efficacement ces substrats et elles ne confèrent généralement pas de résistance aux carbapénèmes et aux C4G. Ces dernières peuvent toutefois être inactivées par des enzymes rares qui dérivent d'AmpC par mutations (Bonnet, 2006).

#### II.2.3.1 AmpC chromosomique

Elles sont décrites chez différentes espèces de bacilles à Gram négatif. On distingue les céphalosporinases chromosomiques constitutives et les céphalosporinases chromosomiques inductibles. Les céphalosporinases chromosomiques constitutives, qui s'expriment à très bas niveau chez *E.coli* et *Shigella spp.* (Courdon et *al.*, 2000), ne sont pas inductibles et sont exprimées à tellement bas niveau qu'elles ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez ces espèces : les souches restent sensibles aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération. Cependant, les céphalosporinases chromosomiques inductibles, décrites chez de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Aromonas spp.*), le caractère inductible est défini par le fait que la synthèse des  $\beta$ -lactamases est augmentée temporairement en présence d'une  $\beta$ -lactamine et disparaît avec l'arrêt de l'exposition (Cavallo et *al.*, 2004).

### II.2.3.2. *AmpC* plasmidique

Les plasmides codants pour les AmpC ont été connus depuis 1989. Elles sont décrites mondialement chez des isolats nosocomiaux ou non nosocomiaux. Les exemples d'AmpC plasmidiques incluent ACC-1, CMY-1, CFE-1, FOX-1, MIR-1, LAT-1 et MOX-1. La majorité des AmpC plasmidiques est constitutive et a des propriétés similaires aux  $\beta$ -lactamases chromosomiques de classe C. D'autres enzymes AmpC plasmidiques inductibles ont été rapportées chez des souches de *K. pneumoniae* de type ACT-1, DHA-1 et DHA-2 (Jacoby, 2009). A ce jour (21/09/2011), on connaît 74 CMY, 4 ACC, 9ACT, 8DHA, 10 FOX, 5MIR, 8MOX, une enzyme LAT-1 et une enzyme de type CFE-1 (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

Les souches produisant une AmpC plasmidique sont résistantes aux aminopénicillines, carboxypénicillines, ureidopénicillines, céphalosporines de troisième génération, céphamycines et aztréonam (Jacoby, 2009).

Les gènes *ampC* sont localisés dans des plasmides ayant une taille variable de 7 à 180 Kb. Certains sont localisés dans des plasmides non autotransférables, mais sont mobilisables. Les plasmides véhiculant les gènes *ampC* codent également les gènes de résistance aux autres familles d'antibiotiques incluant les aminosides, le chloramphénicol, ... Les autres gènes *bla* peuvent aussi coexister dans le même plasmide (Jacoby, 2009).

## II.1.2. BLSE

Les  $\beta$ -lactamases sont le plus souvent classées en deux schéma : la classification moléculaire d'Ambler et la classification fonctionnelle de Buch-Jacoby-Medieors. La classification d'Ambler divise les  $\beta$ -lactamases en quatre classes (A à D) selon les séquences en acides aminés. Les  $\beta$ -lactamases de classes A, C, et D sont des  $\beta$ -lactamases à sérine alors que celles de la classe B sont des métalloenzymes. La classification fonctionnelle de Buch-Jacoby-Medieors 1995 regroupe ces enzymes selon les similarités fonctionnelles (substrat et profils d'inhibition) en quatre groupes (a, b, c, et d) et plusieurs sous groupes (Paterson et Bonomo, 2005). Récemment, Buch et Jacoby (2010) ont mis à jour cette classification. De nouveaux sous groupes se figurent dans cette nouvelle classification. Cette nouvelle classification est donnée et est comparée à l'ancienne classification par le tableau III:



Tableau III : Comparaison de la classification des  $\beta$ -lactamases de Bush Jacoby-Medeiros 1995 et celle de Buch et Jacoby 2009.

Buch et Jacoby (2009)	Buch-Jacoby-Medeiros (1995)	Classification d'Ambler	Substrats	Inhibition		Caractéristiques.	Enzymes représentatives
				AC ou TZP	EDTA		
1	1	C	Céphalosporines	-	-	Hydrolysent mieux les Céphalosporines que les benzylpénicillines; hydrolysent les céphamycines.	AmpC d' <i>E. coli</i> , P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1; MIR-1.
<b>1<sup>e</sup></b>	NI*		Céphalosporines	-	-	Forte hydrolyse du ceftazidime et des autres oxymino- $\beta$ -lactames.	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	+	-	Hydrolysent mieux les benzylpénicillines que les Céphalosporines.	PC1
2b	2b		P+ C1G et C2G	+	-	Même capacité hydrolytique pour les benzylpénicillines et les céphalosporines.	TEM-1 et TEM-2, SHV-1.
2be	2be		C3G et C4G+ monobactames	+	-	Forte hydrolyse des oxymino- $\beta$ -lactames (CTX, CAZ, CX, FEP, ATM).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br		Pénicillines	-	-	Résistance aux inhibiteurs	TEM-30, SHV-10
<b>2ber</b>	NI		C3G et C4G+ monobactames	-	-	Forte hydrolyse des oxymino- $\beta$ -lactames avec une résistance aux inhibiteurs.	TEM-50
2c	2c		Carbenicilline	+	-	Forte hydrolyse des carbenicillines.	PSE-1, CARB-3
<b>2ce</b>	NI		Carbenicilline+ céfépime	+	-	Forte hydrolyse des carbenicillines, FEP et CPO.	RTG-4.
2d	2d	D	Cloxacilline	+/-	-	Forte hydrolyse de cloxacilline ou d'oxacilline.	OXA-1, OXA-10
<b>2de</b>	NI		C3G et C4G	+/-	-	hydrolysent de cloxacilline ou d'oxacilline et des oxymino- $\beta$ -lactames.	OXA-11, OXA-15
<b>2df</b>	NI		Carbapénèmes	+/-	-	hydrolysent de cloxacilline ou d'oxacilline et les carbenicillines.	OXA-23, OXA-48
2 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	A	C3G et C4G	+	-	Hydrolysent les céphalosporines et inhibées par l'ac mais pas l'ATM	CepA
2f	2f		Carbapénèmes	+/-	-	Forte hydrolyse des carbapénèmes, oxymino- $\beta$ -Lactames, céphamycines.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapénèmes	-	+	Un large spectre d'hydrolyse incluant les carbapénèmes mais pas les monobactames.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B2)		-	+		
NI	NI : non identifié	Inconnue				Hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes.	CphA, Sfh-1

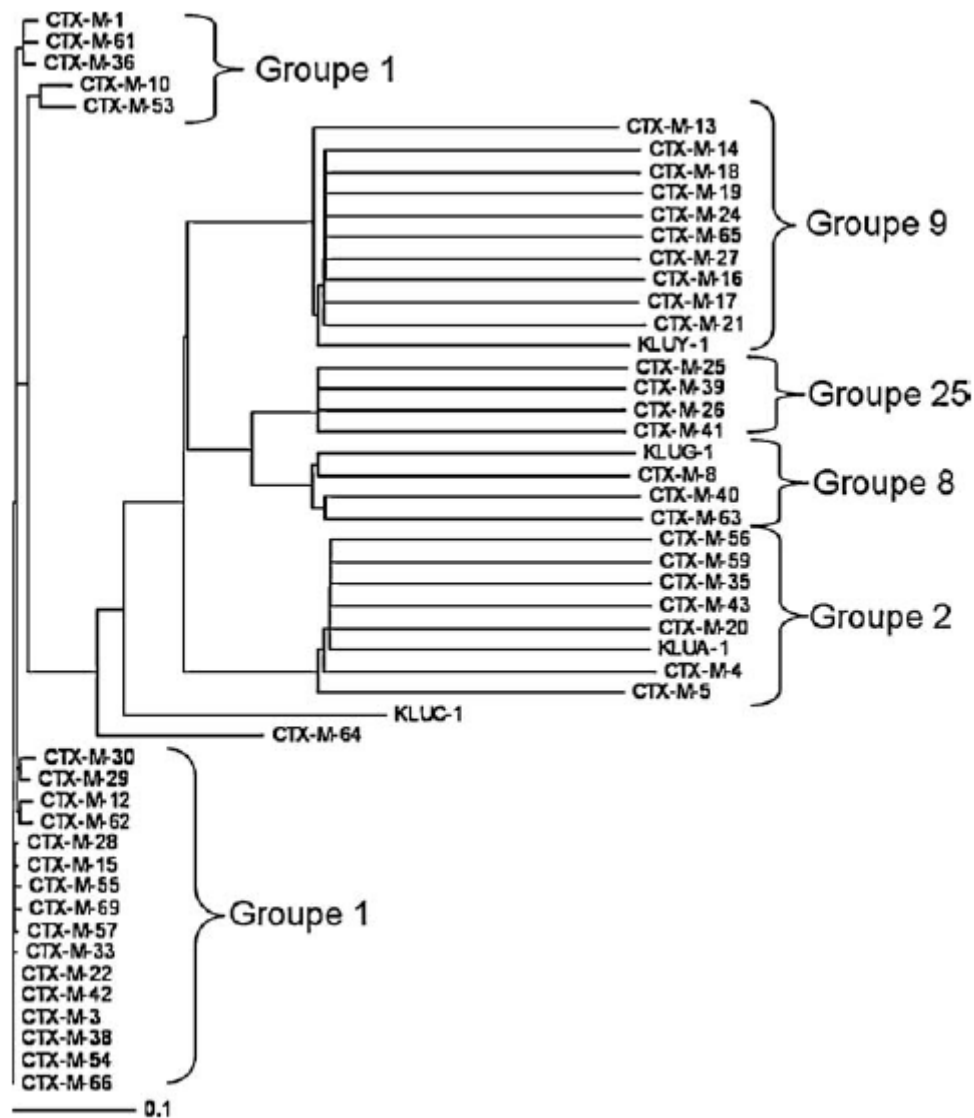
La définition la plus classique des BLSE (sous classe 2be) est : des  $\beta$ -lactamases capables de conférer une résistance aux pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième (excepté les céphamycines) et troisième génération, à l'aztréonam et un taux hydrolytique de 10% pour les benzylpénicillines et elles sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tel que l'acide clavulanique. Plusieurs  $\beta$ -lactamases de type OXA (2d et 2de) sont également considérées des BLSE à cause de l'extension de leur spectre d'hydrolyse vers les céphalosporines à spectre élargie malgré qu'elles sont mal inhibées par le clavulanate. Bien que les BLSE soient rapportées le plus souvent chez les entérobactéries, elles sont également rapportées chez d'autres espèces bactériennes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Naas et al., 2008).

Les BLSE les plus identifiées au passé sont les BLSE de type TEM et SHV qui dérivent, par mutation, des  $\beta$ -lactamases à spectre étroit. Elles sont identifiées pour la première fois en France et en Allemagne en 1984 chez les souches de *Klebsiella pneumoniae* (TEM-3 et SHV-2) (Doit et al., 2010). Les BLSE de type SHV sont considérées, jusqu'à présent, les BLSE les plus répandues quoi que les TEM soient également largement identifiées (Gniadkowski, 2008 ; Poirel et al., 2008). La nature des mutations détermine le spectre d'hydrolyse de l'enzyme et permet de les classer en ceftazidimases qui confèrent un taux de résistance plus élevé à la CAZ qu'au CTX telles que TEM-5 et 24 et SHV-4 et 5 et en céfotaximases qui hydrolysent mieux le CTX que la CAZ telles que TEM-3 et SHV- 2 (Doit et al., 2010).

De nouvelles BLSE, non TEM et non SHV, ont apparu en cliniques dès les années 1990, mais ont depuis émergé dans de très nombreux pays (Philippon et Arlet, 2006). Ces enzymes confèrent une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines hormis les céphamycines et les carbapénèmes. La plupart des CTX-M confère une résistance de haut niveau au céfotaxime et ceftriaxone mais le niveau de résistance au céfépime et ceftazidime est variable (Ruppé, 2010). Les bactéries productrices de CTX-M ont typiquement des CMI > 64  $\mu$ g/ml pour le CTX et entre 2 à 8  $\mu$ g/ml pour la CAZ. Cependant, certaines CTX-M peuvent hydrolyser cette céphalosporine conférant ainsi, des CMI >256  $\mu$ g/ml tel qu'il est le cas pour CTX-M-15, -32, -16, et -27 dérivant respectivement des CTX-M-1, -3, -9, et -14 suite à une mutation ponctuelle au niveau de l'acide aminé en position 240(Asp240Gly) (Paterson et Bonomo, 2005 ; Cattoir, 2008 ; Ruppé ; 2010).

Les gènes CTX-M sont d'origine de bactéries de l'environnement. Il est accepté que l'origine des CTX-M dérive des  $\beta$ -lactamases chromosomiques des espèces de *Kluyvera*. Jusqu'à présent (21 /09/2011), on compte 120 CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) réparties en cinq groupes (Pitout et al.,

2005). A l'intérieur de ces groupes les gènes ont entre eux plus de 94% d'homologie, alors que les groupes entre eux ont moins de 90% d'homologie (Poirel et *al.*, 2008 ; Ruppé, 2010 ; Doit et *al.*, 2010). La figure 01 donne l'arbre phylogénique des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *Kluyvera sp.* et les CTX-M.



**Figure 01 : Phylogénie des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *Kluyvera sp.* et des CTX-M. La CTX-M-64 est une CTX-M hybride entre CTX-M-14 et CTX-M-15 (Ruppé, 2010).**

*Kluyvera ascorbata* (*bla<sub>KLUA</sub>*) est probablement l'origine des CTX-M des groupes 1 et 2 au moment où les CTX-M des groupes 8 et 9 sont d'origine des souches de *Kluyvera georgina*. L'origine des CTX-M du groupe 25 demeure non identifiée jusqu'à présent mais il est fort probable que ça soit d'autres espèces de *Kluyvera* (Rossolini et *al.*, 2008). Un 6<sup>ème</sup>

groupe est également proposé par certains auteurs tels que Rossolini et *coll.* (2008) et Cattoir (2008) qui est le groupe CTX-M-45 qui ne figure pas dans cet arbre.

La dissémination des gènes codants pour les BLSE de type CTX-M est extrêmement inquiétante. Différents éléments génétiques sont impliqués dans leur dissémination et leur acquisition incluant les séquences d'insertion *ISEcp1* et *ISCR1* ainsi que les phages (Poirel et *al.*, 2008). Des séquences d'insertion comme *ISEcp1* et *ISEcp1*-like ont été trouvées de façon répétée en amont de plusieurs gènes codants pour les CTX-M. Ces séquences codent pour des transposases et jouent également un rôle dans l'expression de ces enzymes. Des CTX-M ont également été trouvées au sein des intégrons comme CTX-M-9 et CTX-M-2 qui ont été trouvées sur des intégrons de classe 1. Les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> ont été fréquemment isolés des plasmides de groupe de compatibilité F dont la bonne diffusion au sein de l'espèce *E.coli* pourrait expliquer la dissémination des  $\beta$ -lactamases au sein de cette espèce (Ruppé, 2010).

En 15 ans (1990 à 2005), les BLSE de type CTX-M ont diffusé mondialement chez les entérobactéries d'où le terme « pandémie CTX-M ». Des études épidémiologiques récentes ont rapporté que la situation est endémique dans la plupart des pays Européennes, Asiatiques et d'Amérique de Sud avec de forts taux de prévalence chez les souches d'*E.coli* (30 à 90%) et *Klebsiella pneumoniae* (10 à 60%). Certaines CTX-M ont été retrouvées spécifiquement dans certains pays comme CTX-M-9 et CTX-M-14 en Espagne, CTX-M-1 en Italie et CTX-M-2 en Amérique de Sud et au Japon tandis que CTX-M-15 est mondialement distribuée (Cattoir, 2008).

Au moment où tous les isolats cliniques sont producteurs de BLSE de types TEM, SHV ou CTX-M, plusieurs autres BLSE qui ne sont liées à aucune des enzymes précédentes ont été rapportées. Des exemples incluant les types SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER et VEB. Ces enzymes ne sont pas des dérivées par simple mutation ponctuelle d'aucune des  $\beta$ -lactamases connues et leur origine est inconnue, excepté pour SFO-1. Elles sont nommées les BLSE mineures ou les BLSE rares (Gniadkowski, 2008).

➤ **BLSE de type GES (Guyana Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases)**

Elles sont de plus en plus isolées chez les bacilles à Gram négatif incluant *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae* (Naas et *al.*, 2008). GES-1 a été rapportée pour la première fois en 1998 chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un prélèvement rectal d'un nouveau né hospitalisé au niveau de l'hôpital de Guyenne (Guyane française) puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays bas (Poirel et *al.*, 2000, Poirel et *al.*, 2008). A ce jour (21/09/2011), 18 variantes de l'enzyme GES

(GES-1 à GES-18) ont été décrites (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). L'enzyme GES-1 possède un profil hydrolytique similaire à celui des BLSE de la classe A, incluant l'activité hydrolytique des pénicillines, des céphalosporines à spectre élargie, mais pas des céphamycines et des carbapénèmes. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et l'imipénème (Naas et al., 2008) et contrairement à la plupart des BLSE, GES-1 n'hydrolyse pas l'aztréonam (Poirel et al., 2000). L'enzyme GES-2 montre une activité hydrolytique vis-à-vis de la majorité des  $\beta$ -lactamines, excepté l'aztréonam et le mérépénème. Le taux d'hydrolyse des pénicillines est le même que celui de GES-1. Cependant, l'efficacité d'hydrolyse des céphalosporines à spectre élargie par GES-2 est légèrement plus faible que celle de GES-1. Contrairement à GES-1, GES-2 possède une activité hydrolytique vis-à-vis de l'imipénème (Poirel et al., 2001) et elle est moins sensible aux inhibiteurs à cause d'une substitution Gly170Asn dans son site catalytique. Une substitution Gly170Ser est identifiée chez les enzymes GES-4, GES-5 et GES-6 conduisant à une faible activité hydrolytique des carbapénèmes, faible sensibilité aux inhibiteurs mais elles hydrolysent les céphamycines. L'enzyme GES-9 qui diffère de la GES-1 par la substitution Gly243Ser n'hydrolyse pas les carbapénèmes, mais possède un spectre d'activité élargie vers les monobactames (Rasmussen et Høiby, 2007 ; Gniadkowski, 2008 ; Naas et al., 2008 ; Carattoli, 2009).

L'enzyme GES-2 est le premier exemple de BLSE hydrolysant les carbapénèmes par une simple mutation ponctuelle. Par la suite, quatre autres, avec une activité carbapénémase similaire à celle de GES-2 sont identifiées (GES-4, GES-5, GES-6, et GES-8). Cette évolution peut être un état intermédiaire entre les BLSE et les enzymes de la classe A hydrolysant les carbapénèmes, telles que les KPC (Naas et al., 2008).

➤ **BLSE de type PER (P*seudomonas* E*xtended* R*esistance*)**

PER-1 est initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie. Elle est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* mais aussi détectée chez *S. enterica* sérovar Typhimutrium, *Providencia spp.*, *Proteus mirabilis* et *Alcaligenes faecalis*. Cette enzyme confère une résistance aux pénicillines, céfotaxime, ceftazidime et à l'aztréonam mais pas aux carbapénèmes et aux céphamycines. Son activité est bien inhibée par le clavulanate, sulbactam, et tazobactam. Elle possède un taux d'homologie de 25 à 27% avec les BLSE de type TEM et SHV (Paterson et Bonomo, 2005). A ce jour (21/09/2011), on compte 7 variantes de BLSE de type PER

(<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) mais, l'enzyme PER-2 n'a été détectée qu'en Amérique du Sud (Paterson et Bonomo, 2005).

➤ **BLSE de type VEB (Vietnam Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase )**

L'enzyme VEB-1 a été retrouvée en 1996 dans une souche d'*E. coli* isolée chez un patient vietnamien puis chez *P. aeruginosa* en Thaïlande. Elle possède 38% d'homologie avec PER-1 et PER-2. Plusieurs études épidémiologiques en Thaïlande et au Vietnam ont montré que respectivement jusqu'à 40 à 80% des souches d'entérobactéries et de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime produisaient VEB-1. Cette enzyme est également rapportée chez *P. aeruginosa* au Koweït, en Chine, en Inde, et en Bangladesh, chez *A. baumannii* en France, en Belgique et en Argentine, chez *P. stuartii* en Algérie, chez *Enterobacter cloacae* et *Achromobacter xylosoxiadans* en France, et chez *E. coli* au Canada (Paterson et Bonomo, 2005 ; Cattoir, 2008). A ce jour (21/09/2011) 7 enzymes de type VEB sont identifiées (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

➤ **Autres BLSE de classe A**

• **SFO-1 (Serratia fonticola)**

Cette enzyme est détectée une seule fois chez une souche d'*Enterobacter cloacae* au Japon en 1988. Elle hydrolyse efficacement le céfotaxime et faiblement la ceftazidime mais pas les céphamycines et les carbapénèmes. Son activité est inhibée par l'acide clavulanique et l'imipénème (Naas et al., 2008).

• **BES-1 ( Brazilian extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)**

Cette enzyme est également isolée une seule fois à partir d'une souche de *Serratia marcescens* à l'hôpital de Rio de Janeiro (Brésil) en 1996. Elle confère un haut niveau de résistance à l'aztréonam et un plus haut niveau de résistance au céfotaxime par rapport à la ceftazidime. Elle se caractérise par une activité céfotaximase comparable à celle des CTX-M, mais une activité ceftazidimase beaucoup plus importante et une affinité à l'aztréonam 1000 fois plus importante. Elle est bien inhibée par le clavulanate au moment où le tazobactam est un faible inhibiteur. Les gènes *bla<sub>BES-1</sub>* appartiennent au groupe fonctionnel 2be avec 48% d'homologie avec les CTX-M de groupe 1 (Naas et al., 2008).

- **BEL-1** (*B*elgium *e*xtended-spectrum  $\beta$ -*L*actamase)

Elle est identifiée dans une souche de *Pseudomonas aeruginosa* en Belgique en 2004. Des récents travaux suggèrent que les gènes codants pour BEL-1 pourraient disséminés dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa* en Belgique (Cattoir, 2008). Cette souche de *Pseudomonas aeruginosa* a présenté une image de synergie entre la CAZ et l'AMC. BEL-1 est faiblement liée à d'autres BLSE de la classe A. Elle présente 50% d'homologie avec les BLSE de type GES, 40% avec les CTX-M et 8,36% avec BES-1. Elle hydrolyse efficacement la plupart des céphalosporines à spectre élargie et l'aztréonam. Son activité est inhibée par le clavulanate, la céfoxitine, le moxolactame, et l'imipénème alors que le tazobactam est un faible inhibiteur (Naas et al., 2008).

- **TLA-1** (*T*lahuicas-*t*ribu *i*ndienne)

Décrite chez une souche d'*E.coli* au Mexique en 1993. Depuis, plusieurs cas de bactériémies et d'infections urinaires nosocomiales dues à une souche de *K. pneumoniae* produisant à la fois SHV-5 et TLA-1 ont été rapportés au Mexique, mais cette enzyme n'a jamais été décrite en d'hors de ce pays. Elle hydrolyse les céphalosporines à spectre élargie mais pas la céfoxitine et l'imipénème. Elle est efficacement inhibée par le tazobactam et faiblement par le clavulanate et le sulbactam (Cattoir 2008; Naas et al., 2008).

- **TLA-2**

Elle est codée par un plasmide de 47 Kb qui est isolé dans une souche bactérienne non identifiée en Allemagne en 2002. Elle présente 51% d'homologie avec TLA-1 et se caractérise par une bonne activité catalytique à l'égard de toutes les céphalosporines mais pas les pénicillines, et elle est moins inhibée par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Naas et al., 2008).

➤ **BLSE de type OXA**

Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillines (Classe D ou 2d) ont des propriétés de BLSE. Les  $\beta$ -lactamases de type OXA confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céphalotine. Elles sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline et cloxacilline). De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des oxacillines

n'hydrolyse pas efficacement les céphalosporines à spectre élargie mais l'évolution par mutations ponctuelles vers l'élargissement du spectre a dû avoir lieu (comme pour les dérivées TEM et SHV). Les  $\beta$ -lactamases de type OXA représentent une famille phylogénétiquement très hétérogènes et les BLSE de type OXA dérivent de OXA-10, OXA-13, OXA-2 ou sont non reliées telles que OXA-18 et -45. Bien que la plupart des BLSE dérivées de OXA-10 confère une résistance plus élevée au céfotaxime, les activités enzymatiques des BLSE de type OXA sont très variables. Les BLSE de type OXA sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont été aussi détectées chez d'autres bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries (Paterson et Bonomo, 2005 ; Cattoir, 2008, Naas et *al.*, 2008). A ce jour (21/09/2011), le nombre de BLSE de type OXA qui dérivent d'OXA-10 est compté de 11 BLSE et celles qui dérivent d'OXA-2 est compté de 6 BLSE (<http://www.lahey.org/Studies/>).

### II.1.3. Carbapénèmases

Les carbapénèmases représentent la famille la plus versatile des  $\beta$ -lactamases, avec un spectre large supérieur à celui des autres enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines (Queenan et Buch, 2007). Actuellement, ces enzymes sont rares mais sont une source de préoccupation considérable, car elles sont actives non seulement sur les oxymino-céphalosporines et les céphamycines mais aussi sur les carbapénèmes (Jacoby et Munoz-price, 2005 ; Bassetti et *al.*, 2008). Elles appartiennent à deux familles moléculaires qui se distinguent par leur mécanisme d'hydrolyse et leur site actif : les carbapénèmases à serine et les carbapénèmases à zinc (Queenan et Buch, 2007).

A la fin des années 1980, un déterminant des enzymes hydrolysant les carbapénèmes est émergé parmi les souches d'*Eterobacteriaceae* et dont l'activité de ces enzymes n'est pas inhibée par l'EDTA. Des études ultérieures ont démontré que ces enzymes possèdent un résidu sérine dans leur site actif (classes A et B des  $\beta$ -lactamases) (Bassetti et *al.*, 2008) et leur activité est inhibée par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique et le tazobactam (Cuzon et *al.*, 2010). En plus des carbapénèmases à sérine, la deuxième famille des carbapénèmases sont des métalloenzymes. Contrairement à la première famille, elle est inhibée par l'EDTA à cause de la présence d'un ion de Zinc dans son site actif (Queenan et Buch, 2007).



Les carbapénèmases responsables des CMI élevées aux carbapénèmes appartiennent aux trois classes des  $\beta$ -lactamases : la classe A, la classe B et la classe D (Moland et *al.*, 2008). Le tableau IV résume les différentes classes des carbapénèmases.

**Tableau IV : Différentes classes des carbapénèmases avec leurs profils d'hydrolyse et d'inhibition (Queenan et Buch, 2007).**

Classe moléculaire	Groupe fonctionnel	Enzymes	Profil d'hydrolyse					Profil d'inhibition	
			Pénicillines	C1G et C2G	C3G et C4G	Aztréonam	Carbapénèmes	EDTA	Acide clavulanique
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	+	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

### II.1.3.1. Carbapénèmases de Classe A

Les carbapénèmases de la classe A, du groupe fonctionnel 2f, ont été décrites chez les isolats cliniques depuis leur première découverte, il ya plus de 20 ans. Ces enzymes ont été détectées chez des isolats d'*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Enterobacter hormachei*, *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens*. Les bactéries exprimant ces enzymes sont caractérisées par une diminution de la sensibilité à l'imipénème (Queenan et Buch, 2007).

Cette classe regroupe les membres SME, IMI, NMC, GES et la famille des KPC. Les carbapénèmases de type KPC sont les plus prévalentes, souvent trouvées sur des plasmides chez *Klebsiella pneumoniae* et causent de grands problèmes pour la gestion des maladies infectieuses nosocomiales (Bassetti et *al.*, 2008).

➤ **Enzymes SME**

Ces enzymes sont exclusivement identifiées chez *Serratia marcescens* (*S. marcescens* enzyme) et les trois variantes décrites, diffèrent par la substitution d'un à deux acides aminés. Géographiquement, les isolats producteurs de SME sont collectés au Royaume Uni et sporadiquement à travers les Etats Unis (Rasmussen et Høiby, 2007).

➤ **Enzymes IMI/NMC-A**

Ce groupe inclut les enzymes IMI/NMC-A (Imipénèmase/ Non-métallo-carbapénèmase-A). L'enzyme NMC-A diffère des deux variantes de l'enzyme IMI par la substitution de huit acides aminés. Ces enzymes ont été identifiées sporadiquement dans les isolats cliniques et les isolats des environnements fluviaux aux Etats Unis (Rasmussen et Høiby, 2007).

➤ **Enzymes KPC**

Deux caractères séparent les KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase) des autres enzymes du groupe fonctionnel 2b. Premièrement, les enzymes KPC sont trouvées sur des plasmides transférables, deuxièmement leur spectre d'hydrolyse du substrat qui inclut les céphalosporines de type aminothiazole-oxime comme le céfotaxime. Cependant, les  $\beta$ -lactamases de type KPC, trouvées principalement chez *Klebsiella pneumoniae*, sont également rapportées chez *Enterobacter spp.* et chez *Salmonella spp.* (Queenan et Buch, 2007).

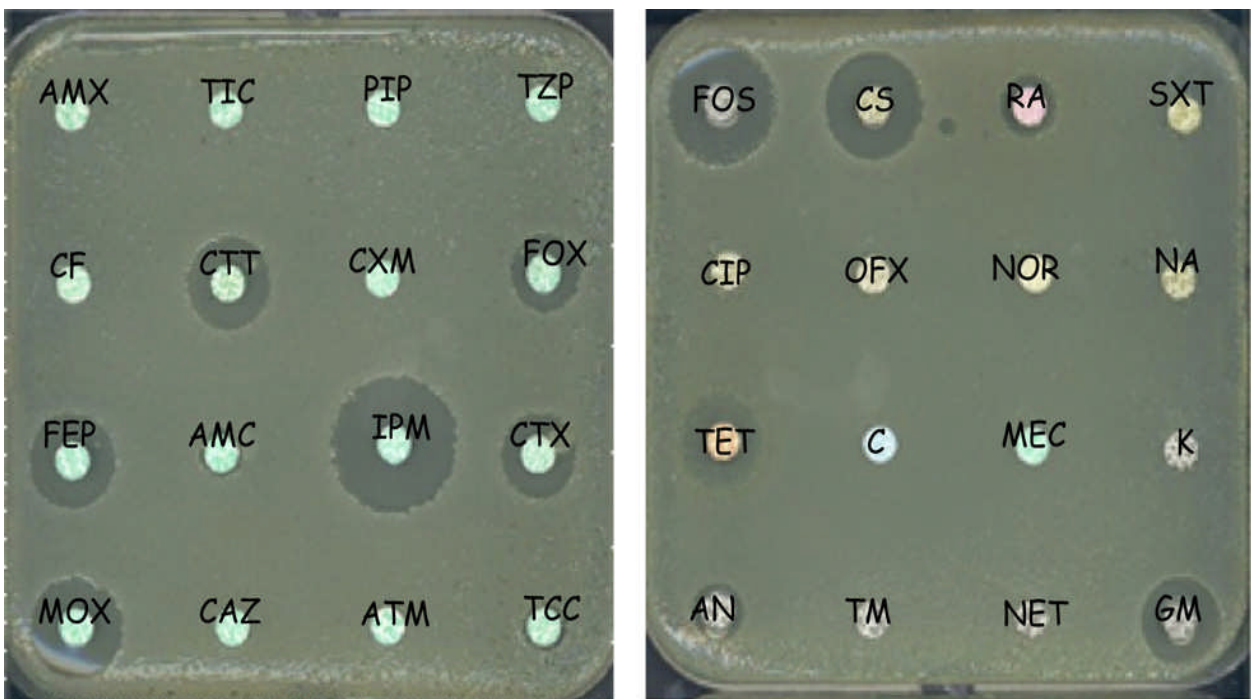
La première KPC, nommée KPC-1, est trouvée chez un isolat de *Klebsiella pneumoniae* à Caroline du Nord en 1996, par la suite à Baltimore en 2003 (Nadkarni et al., 2009). Depuis, des clones de *Klebsiella pneumoniae* producteurs des KPC ont été rapportés à New York et aux autres Etats au Nord-est des Etats Unis. Jusqu'en 2007, uniquement quatre enzymes de type KPC ont été identifiées : KPC-1,-2,-3, et -4 (Moellering et al., 2007). Depuis, d'autres variantes ont été rapportées (KPC-5 à KPC-9). Ces variantes diffèrent entre elles par la substitution d'au moins deux acides aminés (Cuzon et al., 2010). A ce jour (21/09/2011), on compte 12 variantes de l'enzyme KPC (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Les gènes codant pour ces enzymes sont apparemment obtenus via des plasmides conjugatifs ou non conjugatifs, et les gènes cassettes sont flanqués par des transposons qui facilitent le transfert de la résistance entre les souches (Paterson, 2006 ; Moellering et al., 2007).

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser et d'inactiver les carbapénèmes (Paterson, 2006) et toutes les autres  $\beta$ -lactamines. Seule l'activité des céphamycines et de la ceftazidime est peu modifiée (Cuzon et al., 2010). Les souches productrices des enzymes KPC ont montré

généralement une multirésistance qui inclut pipéracilline/tazobactam, les céphalosporines de troisième et de quatrième génération, les fluoroquinolones, les aminoglycosides ainsi que les carbapénèmes (Paterson, 2006).

Les carbapénémases de types KPC-1, -2, -3 ont été observées aux Etats Unis. KPC-1 seule est suffisante pour produire une résistance de haut niveau aux carbapénèmes (CMI=16µg/ml) au moment où KPC-2 et KPC-3 confèrent une résistance de haut niveau aux carbapénèmes uniquement si leur production est liée à la perte des porines de la membrane externe (Keynan et Rubinstein, 2007).

Un exemple d'antibiogramme d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de KPC-2 est montré par la figure 02 (Cuzon et al., 2010).



**Figure 02 : Antibiogramme en diffusion de la souche *Klebsiella pneumoniae* YC portant le gène *bla<sub>KPC-2</sub>* (Cuzon et al., 2010).**

AMX: amoxicilline; TIC: ticarcilline; PIP: pipéracilline; TZP: pipéracilline+tazobactam; CF: céfalotine; CTT : céfotétan; CXM : céfuroxime; FOX: céfoxitine; FEP : céfépime; AMC: amoxicilline+acide clavulanique; IMP: imipénème; CTX: céfotaxime; MOX: moxolactame; CAZ: céftazidime; ATM: aztréonam; TCC: ticarcilline+acide clavulanique; GM : gentamicine; TM : tobramycine; NET: nétilmicine; AN: amikacine; K: kanamycine; MEC :mécilliname; C: chloramphénicol; TE: tétracycline; NA: acide nalidixique; NOR: norfloxacine; OFX : ofloxacine; CIP: ciprofloxacine; SXT: cotrimoxazole; RA : rifampicine; CS : colistine; FOS : fosfomycine.

### II.1.3.2. Carbapénèmases de Classe D

La plupart des carbapénèmases de type OXA est chromosomiques. Certaines comme OXA-50, OXA-51 et OXA-60 ont été rapportées naturellement chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Ralstonia pickettii*, respectivement. Dans certains cas, l'hydrolyse des carbapénèmes est faible par les enzymes OXA, mais la résistance peut être améliorée par des mutations au niveau des porines et des pompes d'efflux (Moland et al., 2008).

La première carbapénèmase de type OXA a été décrite par Paton et coll. en 1993 chez une souche d'*Acinetobacter baumannii*, isolée en 1985 en Scotland. Les oxacillinases sont les  $\beta$ -lactamases plasmidiques les plus répandues à la fin des années 1970 et le début des années 1980. Elles sont identifiées principalement chez les *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Fonctionnellement, elles étaient identifiées comme des pénicillinases capables d'hydrolyser l'oxacilline et la cloxacilline. L'OXA-11, la première variante d'OXA-10, à large spectre a été identifiée pour la première fois en 1993. Les variantes à large spectre OXA-11, OXA-18 et OXA-45 ont un taux d'hydrolyse pour la céftazidime qui varie entre 1% et 1.150 % relatif au taux d'hydrolyse de la pénicilline mais l'hydrolyse de l'imipénème n'a pas été détectée (Queenan et Buch, 2007). A ce jour (21/09/2011), le nombre de  $\beta$ -lactamases de type OXA est de 226 types (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

### II.1.3.3. Carbapénèmases de Classe B

Les M $\beta$ L acquises ou transmissibles par l'intermédiaire des plasmides, des intégrons ou des transposons, sont rapportées chez les micro-organismes tels que *B. fragilis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter spp.*, *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris*, *S. marcescens* et *K. pneumoniae*. L'émergence des M $\beta$ L acquises parmi les pathogènes à Gram négatif est un problème mondial. Il y a cinq familles majeures des M $\beta$ L acquises : IMP, VIM, SPM, GIM, et SIM (Moland et al., 2008). En 1990, la première M $\beta$ L codée par un plasmide a été découverte au Japon (Jacoby et Munoz-price, 2005) chez un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* (Queenan et Buch, 2007). Depuis, d'autres variantes numérotées jusqu'à IMP-23 sont rapportées (Moland et al., 2008) et à ce jour (21/09/2011), on compte 31 enzymes de type IMP (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Ces enzymes hydrolysent l'imipénème, les pénicillines, et les céphalosporines à large spectre mais pas l'aztréonam. La deuxième famille, en croissance, est celle des enzymes VIM (Verona integron-encoded M $\beta$ L). Ces enzymes sont rapportées pour la première fois à Vérone (Italie)

en 1997 chez *Pseudomonas aeruginosa* (Queenan et Buch, 2007) et aujourd'hui (21/09/2011), on compte 32 VIM (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

L'identification de la M $\beta$ L de type SPM-1 a défini une nouvelle famille avec 35,5% d'acides aminés identiques à IMP-1. L'enzyme SME-1(Sao Paolo M $\beta$ L) a été isolée pour la première fois chez une souche *P. aeruginosa* à Sao Paolo au Brésil et à ce jour, uniquement trois enzymes sont décrites (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). En 2002, GIM-1 (German imipenemase) a été isolée en Allemagne, elle possède 30% d'homologie avec VIM et 43% avec l'IMP et 29% avec SPM. La dernière famille des M $\beta$ L acquises est celle des enzymes décrites en Corée : l'enzyme SIM-1(pour Seoul imipenemase) possède un taux d'homologie de 64% à 69 % avec la famille des enzymes IMP. SIM-1 est décrite chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème. Depuis leur découverte, les M $\beta$ L de types SPM, GIM, et SIM ne se sont pas propagées de leurs pays d'origine. Cependant, les enzymes VIM et IMP sont de plus en plus détectées dans le monde avec une tendance globale de ces deux enzymes à se transmettre de *P. aeruginosa* aux entérobactéries (Queenan et Buch, 2007).

## II.2. Nouveaux mécanismes de résistance aux quinolones

### II.2.1. Généralités

Les quinolones ou les fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse amplement utilisés à cause de leur spectre large d'activité (Yamane et *al.*, 2007). Elles sont, depuis les années 1980, des agents largement utilisés dans le traitement des infections du tractus urinaire, causées par *E.coli*, ou d'autres infections causées par d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, d'où la résistance à ces molécules peut causer des échecs thérapeutiques (Maharnal et *al.*, 2005 ; Paterson, 2006).

Les fluoroquinolones sont connues pour avoir deux enzymes cibles dans la cellule bactérienne : l'ADN gyrase et la Topoisomérase IV, deux cibles importantes pour la réplication de l'ADN bactérien. Ces antibiotiques agissent en inhibant ces enzymes en se fixant au complexe ADN-ADN gyrase ou au complexe ADN-topoisomérase IV, ainsi la formation de complexe irréversible bloque la fourche de réplication et donc la synthèse d'ADN est arrêtée (Hooper, 2000).

Depuis l'introduction de l'acide nalidixique en 1960, les quinolones sont de plus en plus utilisées en thérapeutique. Cependant, leur utilisation abusive a abouti à l'augmentation de la résistance à ces molécules (Tran et Jacoby, 2002).

Trois mécanismes de résistance aux quinolones sont fréquemment décrits : les mutations qui altèrent les cibles d'antibiotique, les mutations qui diminuent leur accumulation dans la cellule et les gènes plasmidique qui protègent la cible de leur effet (Ruiz, 2003 ; Jacoby, 2005).

### II.2.2. Résistance plasmidique

Les plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones (PMQR) ont été émergés parmi les souches de *K. pneumoniae* et *E.coli*. Le premier cas de la résistance plasmidique aux quinolones a été rapporté pour la première fois par Martinez -Martinez et coll. en 1998 chez les souches de *K. pneumoniae* isolées en Alabama (USA) en 1994 (Li, 2005 ; Mammeri et al., 2005).

Le plasmide pMG252, appartenant au groupe de compatibilité IncC (Moudgal et Kaatz, 2009), confère une résistance à plusieurs antibiotiques et augmente la résistance aux quinolones lorsqu'il est transféré à des souches de *K. pneumoniae* déficientes des porines de la membrane externe. Le gène associé à cette résistance est désigné *qnr* (Paterson, 2006).

#### ➤ Gène *qnr*

Le gène plasmidique médiateur de la résistance aux quinolones, nommé « *qnrA* », code pour une protéine de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motif pentapeptidique répété ([Ser, Thr, Ala ou Val] [Asp ou Asn] [Leu ou Phe][Ser, Thr ou Arg] [Gly]) ( Jacoby, 2005 ; Robicsek et al., 2006).

Les protéines Qnr agissent par compétition avec les quinolones pour l'accessibilité à l'ADN gyrase et peut-être de la topoisomérase IV (Ruiz, 2003; Jacoby, 2005).

Plus de 500 protéines sont connues pour avoir le pentapeptide répété mais le fonctionnement de la plupart de ces protéines est inconnu. Deux protéines de cette famille sont d'intérêt particulier (Robicsek et al., 2006).

La protéine B17 est une bactériocine qui possède un mécanisme d'action similaire à celui des quinolones ; elle inhibe l'ADN gyrase. Les microorganismes qui produisent cette protéine produisent aussi McbG (protéine d'immunité). McbG possède 19,6% d'acides

aminés homologues à QnrA et protège l'ADN gyrase contre l'effet des bactériocines et de certaines quinolones (Jacoby, 2005 ; Robicsek *et al.*, 2006).

La protéine MfpA, codée par le gène *mfpA*, possède 18,9% d'homologie avec QnrA. Le gène *mfpA* a été identifié pour la 1<sup>ère</sup> fois sur le chromosome de *Mycobacterium smegmatis*. La structure tridimensionnelle de MfpA et la distribution de ses charges ressemblent étroitement à celles de l'ADN. De ce fait, cette protéine est considérée comme un inhibiteur de l'ADN gyrase par compétition à la fixation d'ADN (Jacoby, 2005; Robicsek *et al.*, 2006).

Récemment, Velasco *et coll.* (2010) ont identifié une nouvelle protéine ayant le pentapeptide répété (PRP), nommée SmaQnr, codée par un gène chromosomique chez les espèces de *Serratia marcescens* et qui augmente la résistance aux quinolones lorsqu'elle est exprimée chez les souches d'*E.coli*. Cette nouvelle protéine présente 80% d'homologie avec la protéine Qnr B1.

Les plasmides Qnr ont été identifiés à travers le monde chez différentes souches d'*Enterobacteriaceae*. Le premier gène *qnr* est renommé *qnrA* pour donner le nom Qnr S à la protéine trouvée chez *Shigella flexneri* au Japon et Qnr B découverte chez *K. pneumoniae* en Inde (Jiang *et al.*, 2008 ; Jacoby, 2009 ). Les protéines QnrA, Qnr B et Qnr S ont moins de 60% d'acides aminés en commun (Jacoby, 2009). Les différences entre les séquences de ces différents *qnr* sont présentées par la figure 03 (Nordmann et Poirel, 2005).

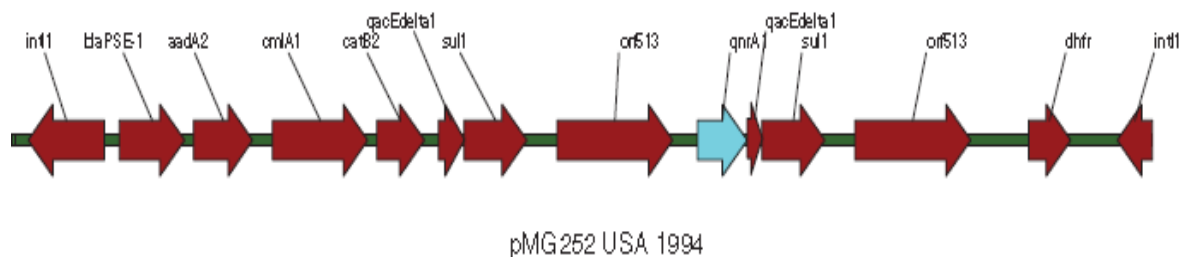
A ce jour (28 /09/2011), plusieurs variantes de ces protéines sont aussi connues. Ces variantes diffèrent de la protéine originale uniquement par quelques acides aminés, qui sont Qnr A1-7, Qnr B1-42, Qnr S1-5, 1 Qnr C et 1 Qnr D (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>).



Figure 03 : Comparaison des séquences des plasmides médiateurs des déterminants QnrA, QnrB et QnrS (Nordmann et Poirel, 2005).



Les gènes *qnr A*, *qnr B*, *qnr S* sont trouvés dans des intégrons de type *Sul I*, cependant ils sont dépourvus de 59 éléments de bases, souvent associés avec les gènes cassettes. Le gène *qnr A1* est invariablement trouvé en aval d'*ISCR1* (autrefois nommé ORF 513). Le gène *qnr B* est associé avec *ISCR1* dans certains plasmides et aussi trouvé à proximité de ce qui est, peut être, un élément similaire nommé ORF1005. Enfin, le gène *qnr S* n'est pas lié à des gènes pareils mais plutôt à des éléments de types *Tn3* ou IS (Jacoby, 2009). La figure 04 présente la structure de l'intégron contenant le gène *qnr A1* des Etats Unis (Jacoby, 2009).



**Figure 04 : Structure de l'intégron contenant le gène *qnr A1* des Etats Unis (Jacoby, 2009).**

#### ➤ **Gène *aac (6')-Ib-cr***

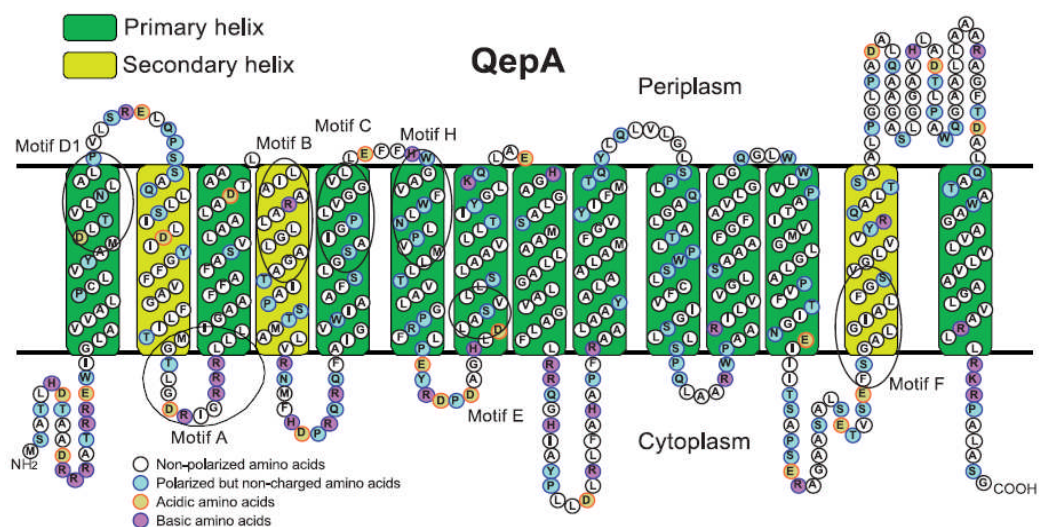
Robicsek et ses collaborateurs ont identifié une variante du gène *aac(6')-Ib* chez des isolats cliniques de bactéries à Gram négatif qui ont acquis la capacité de modifier les fluoroquinolones (Magalhães et Blanchard, 2009). Ce gène code pour la protéine AAC (6')-Ib-cr, une variante d'aminoglycoside acétyle transférase, qui confère une résistance aux aminoglycosides et à certaines quinolones. Elle est capable de modifier la ciprofloxacine et plusieurs autres fluoroquinolones et de réduire leur activité. Cette protéine est maintenant reconnue pour sa prévalence et sa coexistence avec les gènes *qnr* (Jiang *et al.*, 2008).

Le gène *aac(6')-Ib* a été découvert après peu de temps de la découverte du gène *qnr A*. Il peut conférer une résistance à la tobramycine, l'amikacine et à la kanamycine (Robicsek *et al.*, 2006). Des souches sauvages d'*E.coli* ont des CMI de 0,008µg/ml à la ciprofloxacine. La plupart des plasmides *qnr* détermine une CMI de 0,25µg/ml chez *E.coli*. Cependant, il a été observé que certains plasmides issus des souches cliniques d'*E.coli*, collectées à Shanghai, confèrent une résistance quatre fois plus élevée à la ciprofloxacine (1µg/ml). Ce haut niveau de résistance n'était pas dû à l'hyper expression du gène *qnr* mais à l'expression d'un aminoglycoside acétyle transférase (Robicsek *et al.*, 2006).

### ➤ Gène *qep A*

Le troisième type des plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones implique les pompes d'efflux de type RND ou de type MFS (Jacoby, 2009), c'est le gène des pompes d'efflux des quinolones *qep A*. Il est probablement transféré par des éléments transposables flanqués par deux copies de IS 26 (Jiang *et al.*, 2008).

Ce gène encode pour une protéine de 511 acides aminés, nommée QepA. Cette protéine est impliquée dans l'excrétion de la norfloxacine du cytoplasme vers l'extérieure de la cellule. La structure secondaire de la protéine Qep A est présentée par la figure 05 (Yamane *et al.*, 2007).



**Figure 05 : Structure secondaire prédite de QepA (Yamane *et al.*, 2007) .**

## II.3. Nouveaux mécanismes de résistance aux aminosides

### II.3.1. Généralités

Les aminosides sont une classe d'antibiotique très importante pour le traitement des infections nosocomiales causées par les bactéries aérobies à Gram négatif (Magalhães et Blanchard, 2009). L'histoire des aminosides a commencé en 1944 par la streptomycine. Par la suite, par l'introduction d'une série de composé (kanamycine, gentamicine, et la tobramycine) qui a démontré l'efficacité de cette famille pour le traitement des infections causées par les bacilles à Gram négatif (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

Les aminosides ciblent le site aminoacyle (site A) de l'ARNr 16S de la sous unité ribosomal 30S des procaryotes et interfèrent ainsi avec la synthèse protéique (Kaul *et al.*, 2007). La résistance à ces molécules peut être conférée par des enzymes modifiant l'antibiotique (acétyltransférases, nucléotidyltransférases et les phosphotransférases), défaut d'accumulation et la modification de la cible (Wachino *et al.*, 2007).

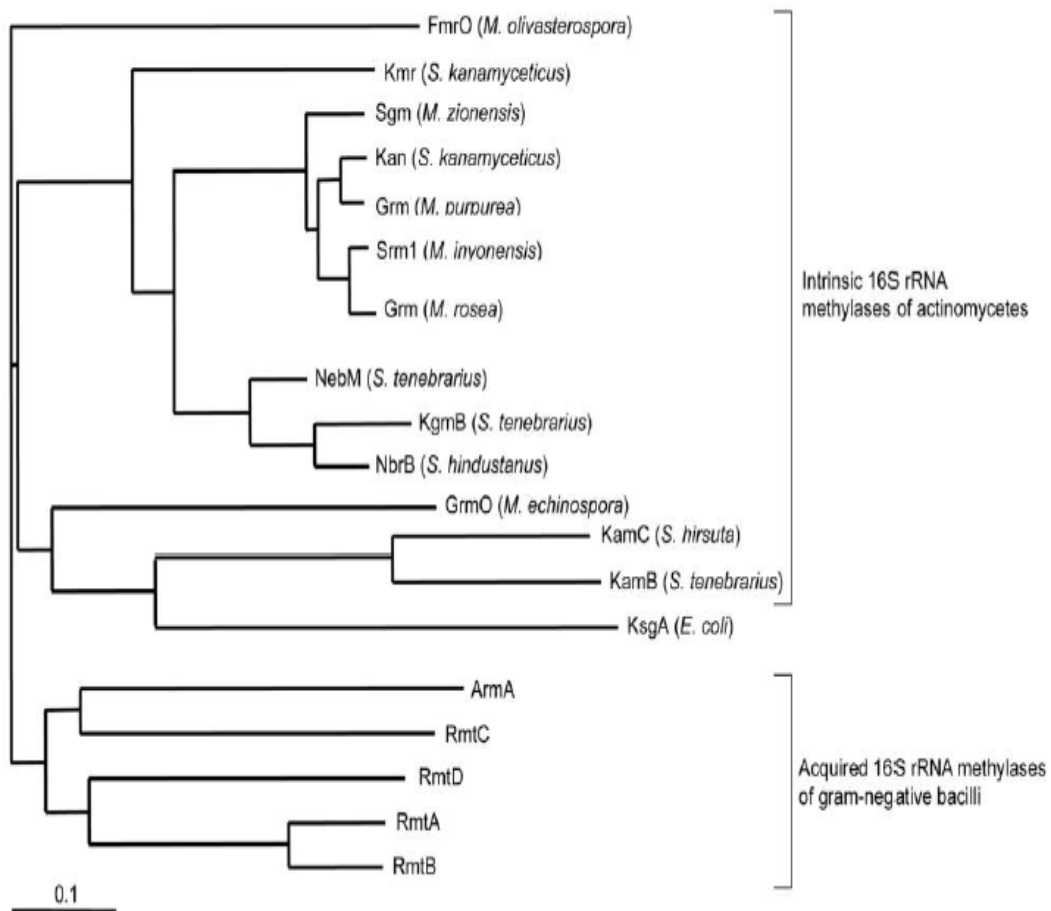
### II 3.2. Résistance plasmidique aux aminosides

Les aminosides sont produits par des espèces des actinomycètes tels que *Streptomyces* et *Micromonospora*. Ces actinomycètes sont intrinsèquement résistants aux aminosides qu'ils produisent. Dans la plupart des cas, les actinomycètes résistent à ces antibiotiques par protection du ribosome via la méthylation des nucléotides spécifiques de l'ARNr 16S qui empêche les aminosides de se lier à leur cible. Ainsi, les actinomycètes se protègent contre l'antibiotique produit (Doi et Arakawa, 2007).

Récemment une série des méthylases qui protègent l'ARNr 16S est identifiée chez plusieurs pathogènes nosocomiaux tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Serratia marcescens* (Yamane *et al.*, 2005). Ces enzymes confèrent une résistance de haut niveau aux aminosides utilisés en cliniques tels que l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine (Doi et Arakawa, 2007).

Durant ces dernières années cinq méthylases de l'ARNr 16S ont été identifiées chez les bactéries à Gram négatif : ArmA, RmtA, RmtB, RmtC et RmtD (Doi *et al.*, 2007).

La figure 06 présente un dendrogramme des méthylases de l'ARNr 16S chez les bactéries à Gram négatif et celles des actinomycètes. Il est à noter que KsgA est une méthylase intrinsèque de l'ARNr 16S chez *E.coli* mais qui ne confère pas de la résistance aux aminosides (Doi et Arakawa, 2007).



**Figure 06 : Dendrogramme des méthylases de l'ARNr 16S des bactéries à Gram négatif et des actinomycètes (Doi et Arakawa, 2007).**

### ➤ *ArmA*

En 2002, un gène codant pour une méthylase de l'ARNr 16s, nommé après *ArmA*, a été identifié chez des souches de *Citrobacter freundii* isolées en Pologne. Puis en 2003, ce gène a été identifié chez des souches de *K. pneumoniae* en France. Il confère une résistance de haut niveau aux 4,6-désoxystreptamines disubstitués. La séquence en acides aminés de cette protéine montre une homologie de 30% et de 35% avec *RmtA* et d'autres méthylases, respectivement. Le gène *armA* a été trouvé chez une large gamme de plasmides qui portent un intégron de type I. Cet intégron est un médiateur de plusieurs gènes cassettes responsables de

la multirésistance aux antibiotiques (Yamane et *al.*, 2005). Ce gène se localise sur un transposon composite *Tn1548* (Doi et Arakawa, 2007).

➤ ***RmtA***

En 2003, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux aminosides, rapportée au Japon, était productrice d'une méthylase de l'ARNr 16S. La séquence en acides aminés de cette méthylase présente 35% d'homologie avec les autres méthylases des actinomycètes (Doi et Arakawa, 2007) et 82% avec RmtB (Yamane et *al.*, 2005).

L'analyse de l'environnement génétique du gène *rmtA* a démontré qu'il est associé à un transposon codant pour la résistance au mercure *Tn 5041* (Yamane et *al.*, 2005) sur un plasmide transférable. Le contenu en GC% du gène *rmtA* a été de 55%, ce qui suggère que l'origine de ce gène est bien que les bactéries riche en GC% y compris les actinomycètes (Doi et Arakawa, 2007).

➤ ***RmtB***

La protéine RmtB était identifiée pour la première fois chez *Serratia marcescens* (Doi et Arakawa, 2007) au Japon en 2004 (Yamane et *al.*, 2005). La séquence en acides aminés de cette protéine est très proche de RmtA, elles ont 82% d'homologie. La structure du gène *rmtB* s'est trouvée adjacente d'un transposon like-*Tn3* sur un plasmide transférable (Doi et Arakawa, 2007).

➤ ***RmtC***

Le gène *rmtC* codant pour la protéine RmtC a été identifié pour la première fois chez une souche clinique de *Proteus mirabilis* au Japon. Ce gène est plutôt loin de la phylogénie des méthylases précédemment citées. La structure de ce gène est aussi localisée à côté d'un système de transposon médiateur de la recombinaison, nommé *ISEcp1*, et le gène de la méthylase est mobilisé d'un plasmide à un autre (Doi et Arakawa, 2007).

➤ ***RmtD***

C'est une méthylase identifiée pour la première fois chez une souche clinique de *P. aeruginosa*, isolée en Brésil, qui produit aussi une métallo- $\beta$ -lactamase de type SPM-1. Cette souche particulière était aussi hautement résistante aux carbapénèmes comme aux

aminosides. La séquence en acides aminés de cette protéine présente de 40% à 42% d'homologie avec RmtA et RmtB (Doi et Arakawa, 2007).

## 1. Prélèvements

### 1.1. Recueil des données

Notre étude s'est déroulée pendant la période allant d'Octobre 2010 à Mai 2011 et a consisté en la collecte de souches de bacilles à Gram négatif, isolées de deux laboratoires d'analyses médicales privés de la région de Béjaïa (Djama de la ville de Béjaïa et Ait Bachir de la ville d'Akbou).

Cette étude a pour but l'étude des profils des mécanismes de résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolées dans les laboratoires d'analyses médicales privés et la détermination de quelques facteurs de risque dans leur acquisition. A cet effet, les données concernant l'âge, le sexe, l'hospitalisation et l'antibiothérapie antérieures sont notées dans un formulaire (**Annexe I**).

### 1.2. Prélèvements

Les souches de bacilles à Gram négatif collectées proviennent de différents prélèvements pathologiques : urine, selles, sperme, pus, et expectoration. Les différentes techniques de prélèvements préconisées durant notre étude sont données en **Annexe II**.

## 2. Isolement

Trois milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement des souches de bacilles à Gram négatif, ils s'agissent de la gélose Hektoen, EMB ou BCP (selon leur disponibilité). La composition de ces milieux est donnée en **Annexe III**. Les techniques d'isolement à partir des différents prélèvements sont en **Annexe II**.

## 3. Identification

Après incubation, l'aspect des colonies ayant poussé sur le milieu de culture utilisé est examiné. Si la culture est polymicrobienne, des repiquages successifs sont réalisés afin de purifier les souches isolées.

L'identification des souches de bacilles à Gram négatif est réalisée sur la base de : la coloration de Gram, l'oxydase, la catalase, une galerie API 10S (Biomérieux) et une galerie biochimique.

➤ **Coloration de Gram**

Cette technique s'effectue sur une culture fraîche de 18 à 24h. Elle se déroule en trois principales phases :

Le frottis, séché et fixé, est recouvert de violet de Gentiane ou de cristal violet phéniqués pendant une minute, puis lavé à l'eau distillée. Toutes les bactéries prennent ce colorant. Ensuite, la lame est recouverte par une solution de lugol (iode ou iodure de potassium) qui joue un rôle mordant durant 30 seconds ;

Après lavage à l'eau distillée, le frottis est soumis à l'action de l'éthanol à 95° durant 10 s. L'éthanol dissolvant le violet de Gentiane permet la décoloration des bactéries à Gram négatif. Les bactéries Gram positives restent violettes ;

Après un lavage rapide à l'eau distillée, la préparation est recouverte par un deuxième colorant (la safranine ou la fuchsine basique phéniquée) pendant une minute. Ce colorant permet de recolorer en rose les bactéries précédemment décolorées.

En fin, la lame est lavée pour une dernière fois à l'eau distillée, puis séchée et observée à l'immersion.

Au terme de cette technique, nous obtenons la forme et le Gram des bactéries isolées.

➤ **Test d'oxydase**

Un papier filtre est imprégné par le réactif d'oxydase (biométrieux), puis une colonie d'une culture fraîche est déposée. Un résultat positif se manifeste par une couleur rose foncé puis violette au niveau de dépôt de la colonie. C'est un test discriminatoire entre le genre *Pseudomonas* et les *Enterobacteriaceae*

➤ **Test de catalase**

Il présente un intérêt taxonomique pour les bactéries à Gram positif. Il consiste à mettre en contact l' $H_2O_2$  et les bactéries à étudier. Une réaction positive est révélée par l'apparition de bulles de Gaz.



### ➤ *Galerie API 10S*

L'identification par une galerie API 10S peut être résumée en trois étapes :

Primo, la préparation d'une galerie consiste à réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation, puis environ 5 ml d'eau distillée sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Enfin, la galerie est placée dans la boîte d'incubation.

Secundo, la préparation d'une suspension bactérienne dense en prélevant quelques colonies, identiques et bien isolées, et les mettre dans 5ml d'eau physiologique stérile.

Tertio, le remplissage de la galerie: le **tube et cupule** du test **[CIT]** sont remplis avec la suspension bactérienne, mais pour les autres tests c'est **uniquement les tubes** (et non les cupules). Une anaérobiose est réalisée dans les tests **LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Enfin, la boîte d'incubation est fermée et est incubée à 37°C pendant 18 à 24 h.

### ➤ *Lecture de la galerie*

Après incubation, toutes les réactions spontanées sont notées sur la fiche des résultats puis, la révélation des tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, IND et NO<sub>2</sub>). La lecture de la galerie se réfère au tableau de lecture donné en **Annexe IV**. Le test d'oxydase et la réduction des nitrates en nitrites constituent respectivement le 11<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> test d'identification à noter sur la fiche des résultats. L'identification est obtenue par la recherche du profil numérique (à 4 chiffres) dans la liste de la notice (**Annexe V**).

### ➤ *Galerie biochimique classique*

Une série de tests est effectuée pour les souches résistantes au céfotaxime et/ou la céftazidime, l'acide nalidixique et/ou à la gentamicine. Pour cette raison, les souches sélectionnées sont repiquées et purifiées, si c'est nécessaire, avant de réaliser une galerie biochimique classique. L'identification des bacilles à Gram négatif est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques (Le Minor et Richard, 1993) dont :

- Utilisation du glucose, du lactose, la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S sur gélose TSI ou KIA.
- Recherche de la nitrate-réductase sur bouillon nitraté.
- Recherche d'uréase, production d'indole, et d'une TDA sur milieu urée-indole.
- Etude du type fermentaire (réaction de Voges-Proskauer et RM) sur milieu Clark et Lubs.

- Fermentation du mannitol et mobilité sur milieu mannitol-mobilité.
- Utilisation du citrate sur milieu citrate de Simmons.

(La composition de ces milieux est donnée en **Annexe III**).

#### **4. Etude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques**

Nous avons testé la sensibilité des bacilles à Gram négatif identifiées vis-à-vis de onze  $\beta$ -lactamines: céfalotine, Céfuroxime, céfoxitine, céfotaxime, ceftazidime, céfépime, cefpirome, l'amoxicilline, acide clavulanique-amoxicilline, l'aztréonam et l'imipénème ; 3 quinolones et des fluoroquinolones: acide nalidixique, norfloxacin et ciprofloxacine ; 3 aminosides: gentamicine, tobramycine et amikacine et la colistine de la famille des polymexines 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 (communiqué du CFA-SFM, 2010). Les charges d'antibiotiques testés, leurs abréviations ainsi que les diamètres et les concentrations critiques sont données en **Annexe VI**.

##### **4.1. Antibiogramme standard**

###### **\* Milieu**

Nous avons utilisé la gélose Mueller Hinton prête à l'emploi ou reconstituée. L'épaisseur de la gélose est de 4 mm (20ml).

###### **\* Inoculum**

A partir d'une culture pure de 18-24h sur milieu d'isolement, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% et bien homogénéisée. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop dense (Rahal et *al.*, 2008 ; communiqué du CFA-SFM, 2010).

###### **\* Ensemencement**

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne diluée au 1/10, puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger le maximum.

Ensuite, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et passant sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (Rahal et *al.*, 2008 ; communiqué du CFA-SFM, 2010).

#### \* Application des disques d'antibiotiques

Chaque disque d'antibiotique (Biomérieux, Bio Rad) est déposé à l'aide d'une pince afin de s'assurer de son application. Le disque, une fois déposé, ne doit pas être déplacé. Les antibiotiques à tester sont sélectionnés selon la bactérie isolée. La liste des d'antibiotiques à tester selon le germe isolé est donnée dans les tableaux V et VI (Communiqué du CFA-SFM, 2010).

**Tableau V: Liste standard des antibiotiques à tester pour les bacilles à Gram négatif** (communiqué du CFA-SFM, 2010)

Liste standard		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>Amoxicilline</b> ou ampicilline	Ticarcilline	Ticarcilline
<b>Amoxicilline/ac.*</b>	Pipéracilline	Ticarcilline/ac. clavulanique
<b>clavulanique</b>	<b>Ceftazidime</b>	Pipéracilline
ou ampicilline/sulbactam	<b>Imipénème</b> ou	Pipéracilline/tazobactam
Mécillinam	méropénème	<b>Ceftazidime</b>
<b>Céfalotine</b>	<b>Aztréonam</b>	<b>Imipénème</b>
Ceftriaxone ou <b>céfotaxime</b>	<b>Gentamicine</b>	<b>Gentamicine</b>
Céfixime	<b>Tobramycine</b>	<b>Tobramycine</b>
<b>Gentamicine</b>	<b>Amikacine</b>	<b>Amikacine</b>
<b>Amikacine</b>	<b>Ciprofloxacine</b>	Cotrimoxazole
<b>Acide nalidixique</b>	<b>Colistine</b>	<b>Ciprofloxacine</b>
<b>Norfloxacine</b>		
<b>Ciprofloxacine</b>		
Cotrimoxazole		
Nitrofuranes		
Fosfomycine		

\*Sont uniquement les antibiotiques écrits en gras qui sont testés dans notre étude.

**Tableau VI: Liste complémentaire des antibiotiques à tester pour les bacilles à Gram négatif** (communiqué du CFA-SFM, 2010).

Liste complémentaire		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Ticarcilline	Ticarcilline/ac.	Sulbactam
Ticarcilline/ac. clavulanique	clavulanique	<b>Céfépime</b>
Mezlocilline ou pipéracilline	Pipéracilline/tazobactam	<b>Cefpirome</b>
Pipéracilline/tazobactam	<b>Céfépime</b>	Méropénème
Céfamandole	Cefsulodine	Nétilmicine
<b>Céfuroxime*</b>	Nétilmicine	Iséamicine
<b>Céfoxitine</b>	Iséamicine	Chloramphénicol
Céfotétan	Lévofloxacine	Tétracycline
Latamoxef	Sulfamides	Tigécycline
<b>Ceftazidime</b>	Fosfomycine	<b>Colistine</b>
<b>Céfépime</b> ou <b>cefpirome</b>		<b>Rifampicine</b>
<b>Aztréonam</b>		
<b>Imipénème</b> ou méropénème		
Ertapénème		
Kanamycine		
<b>Tobramycine</b>		
Nétilmicine		
Iséamicine		
Chloramphénicol		
Tétracycline		
Minocycline		
Tigécycline		
Péfloxacine ou <b>ofloxacine</b>		
Sulfamides		
Triméthoprim		
<b>Colistine</b>		

\*Sont uniquement les antibiotiques écrits en gras qui sont testés dans notre étude.

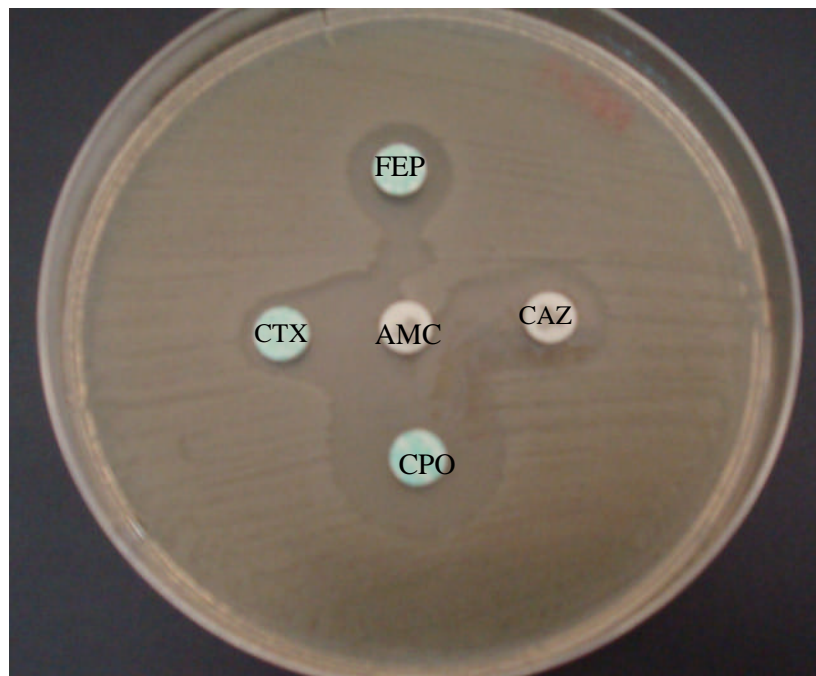
### \* Lecture

Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CFA-SFM (communiqué du CFA-SFM, 2010) (**Annexe VI**).

#### 4.2. DD-TEST (ou test de synergie)

La production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi a été détectée par l'épreuve de la synergie qui consiste à placer des disques de ceftazidime, céfotaxime, céfépime et ceftiofame (30  $\mu$ g chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (amoxicilline/clavulanate) (20/10  $\mu$ g). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'augmentin et les disques de ceftazidime, céfotaxime indique la production d'une BLSE (Jarlier *et al.*, 1988).

La disposition des disques de  $\beta$ -lactamines sur la gélose Mueller Hinton ainsi que la présence d'image de synergie pour la souche HD27 sont donnée par la figure 07.

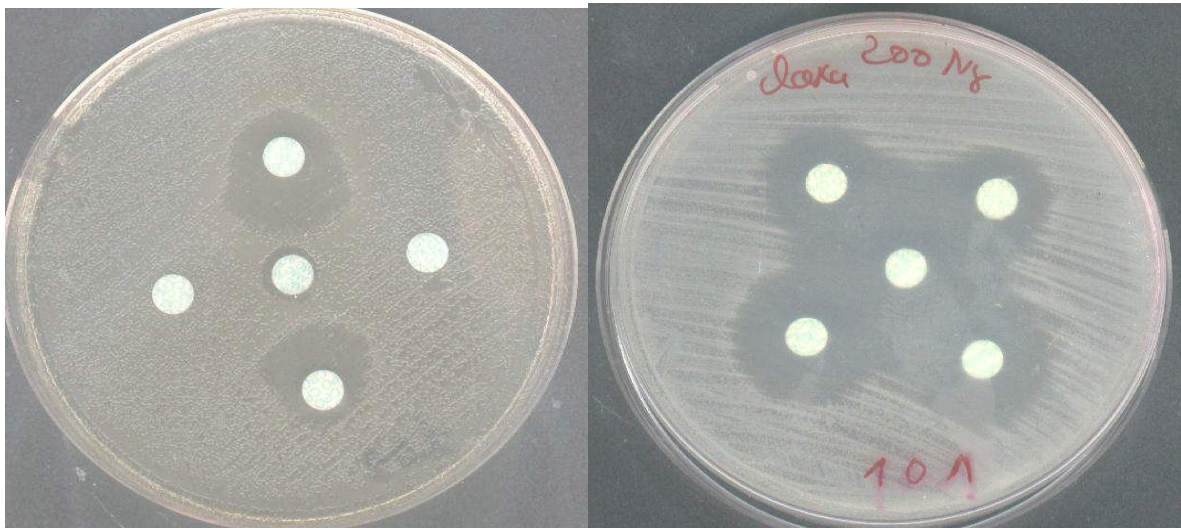


**Figure 7: Disposition des disques d'antibiotiques.**

### 4.3. DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline

La présence d'une BLSE peut être masquée par la production d'une céphalosporinase, induite par le clavulanate chez les souches naturellement productrices de cette enzyme tel qu'il est le cas pour *Enterobacter cloacae*. Afin d'inhiber l'activité céphalosporinase, le test de synergie est refait sur la gélose Mueller Hinton additionnée de la cloxacilline (250 ou 500 µg/ml selon le niveau de la résistance). La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE ou l'hyperproduction de céphalosporinase (Giraud-morin et Fosse, 2008).

L'antibiogramme standard de la souche *Enterobacter cloacae*, sur gélose MH à gauche et sur gélose MH à la cloxacilline 200µg/ml à droite, démontre l'hyperproduction d'une céphalosporinase chromosomique (figure 08).



**Figure 08: DD-test sur gélose MH additionnée de la cloxacilline**

### 4.4. Recherche de la production de métallo $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L)

La recherche de M $\beta$ L est systématique chez toutes les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème selon la méthode de Yong et *al.*, 2002 en utilisant une solution stérilisée par autoclavage d'EDTA à 0,5 M pH 8 (Annexe VII) Dans ce but, deux méthodes ont été suivies et combinées sur la même boîte (figure 09).

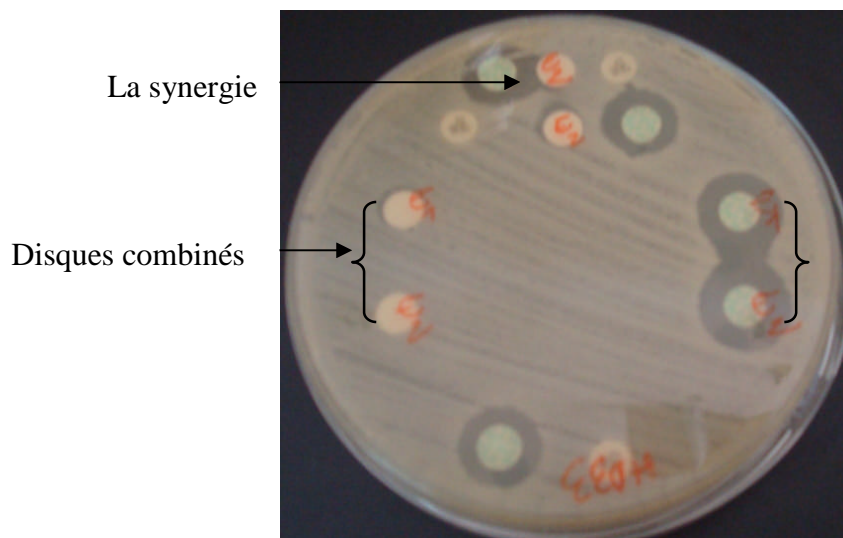
### \* Recherche de synergie

Un DD-test est réalisé avec un disque d'imipénème (10 $\mu$ g) et un disque imbibé avec 10 $\mu$ l de solution d'EDTA à 0,5 M et espacés de 15mm. (Jeong *et al.*, 2006). Le même test est effectué tout en rapprochant les disques comme il est illustré par la figure 09.

La présence d'une M $\beta$ L est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA.

### \* Méthode des disques combinés

Un antibiogramme est réalisé en utilisant deux disques d'imipénème (10 $\mu$ g) déposés suffisamment distants sur la même boîte de Pétri, l'un comme témoin et sur l'autre un volume de 4  $\mu$ l de solution d'EDTA à 0,5 M (E<sub>2</sub>) (Ait el Kadi *et al.*, 2006). Le même test est refait avec une solution d'EDTA à 0,125 M (E<sub>1</sub>).



**Figure 09: Technique de la recherche des M $\beta$ L**

Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 16 à 18 h d'incubation à 37 °C. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul, d'au moins 6mm, sont considérées comme souches productrices de M $\beta$ L (Yong *et al.*, 2002).

## 5. Conjugaison et transfert de la résistance

La conjugaison est réalisée pour des souches résistantes à la ceftazidime (4 $\mu$ g/ml) et sensibles à la rifampicine 240  $\mu$ g/ml. Les souches utilisées sont : A102, A62, A100, A35, A84, A53, A15, A99, HD33, HD12, HD06, HD27, HD40, HD51, A37, A61, A10, A40 et A36.

**\* Matériel**

- Souche réceptrice *EC 600* résistante à la rifampicine et sensible aux autres antibiotiques.
- Bouillon trypticase soja (TSB)
- Gélose Mueller Hinton
- Solution de la rifampicine (600mg/ml)
- Solution de ceftazidime (100 mg/ml)

**\* Protocole** (Aibinu et *al.*, 2003)

- On cultive les souches donatrices et la souche réceptrice dans 5 ml de bouillon trypticase soja. On incube une nuit à 37°C au bain-marie avec agitation.
  - On effectue une dilution décimale de la souche donatrice et on étale à l'aide d'un râteau 1 ml de la dilution  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  sur la surface de la gélose Mueller Hinton. On incube à 37°C pendant 18h.
  - Dans un erlen stérile, 1 ml de la culture de la souche donatrice avec 1 ml de la culture de la souche réceptrice et 1ml du bouillon TSB neuf sont mélangés (rapport 1/1/1) ;
  - On incube le mélange et les témoins à 37°C pour 4h.
  - Le milieu de sélection des transconjugants est représenté par la gélose Mueller Hinton contenant deux antibiotiques : l'un est le ceftazidime (concentration finale de 4 µg/ml) qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice et l'autre la rifampicine (concentration finale de 240µg/ml) qui est un caractère chromosomique de la souche réceptrice.
  - On étale 500 µl du mélange sur la surface des boîtes de sélection.
  - On incube les boîtes de sélection à 37°C pendant 18h.
  - On dénombre les colonies de la souche donatrice ayant poussé sur la gélose Mueller Hinton.
  - On dénombre les colonies des transconjugants ayant poussé sur la gélose de sélection.
- On calcule le rapport : Nombre de transconjugants / nombre de donatrices. Ce rapport exprime la fréquence de transfert.



## 6. Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 1995)

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est effectuée pour 22 souches d'entérobactéries, 3 souches d'*Acinetobacter baumannii* et les transconjugants obtenus. Ces souches se caractérisent par la résistance à plus de deux familles d'antibiotiques, c'est pour cela, elles sont dites bactéries multirésistantes.

### 6.1. Détermination des CMI pour les souches d'entérobactéries sensibles à la céfoxitine

Pour les souches d'entérobactéries sensibles à la céfoxitine et les transconjugants, les CMI sont déterminées par rapport à la ciprofloxacine (CIP), la gentamicine (G), le céfotaxime (CTX), la ceftazidime (CAZ), l'aztréonam (ATM) et le céfépime (FEP).

Il est à noter pour la souche A15, qui n'est pas une entérobactérie, que sa CMI a été déterminée avec les souches sensibles à la céfoxitine.

#### \* Matériel

- Une solution mère de la ciprofloxacine à 2mg/ml ;
- Une solution mère de la gentamicine à 40 mg/ml ;
- Une solution mère du céfotaxime à 100 mg/ml ;
- Une solution mère de la ceftazidime à 2 mg/ml ;
- Une solution mère de l'aztréonam à 1mg/ml ;
- Une solution mère du céfépime à 20 mg/ml ;
- Milieu Mueller Hinton prêt à l'emploi ou reconstitué ;
- Eau distillée stérile ;
- Boîtes de Pétri.

#### \* Préparation des boîtes

A partir d'une solution mère de chaque antibiotique, une gélose Mueller Hinton en surfusion est additionnée d'une concentration croissante d'antibiotique allant de 2µg/ml à 128 µg/ml (**Annexe VIII**). Il est à noter que des dilutions décimales ont été réalisées afin de préparer de faibles concentrations d'antibiotiques.

Après homogénéisation, la gélose additionnée d'antibiotique est coulée dans des boîtes, puis séchée à l'étuve à 37°C.

### \* Ensemencement

Une suspension bactérienne de  $10^8$  UFC/ml est diluée à 1/10, puis 10 $\mu$ l de cette dilution est déposé sur le milieu par spot en trois répétitions (figure 10). Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

### \* Lecture

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotiques pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une à deux colonies ou d'un film n'est pas prise en considération (Ca-SFM, 1995).

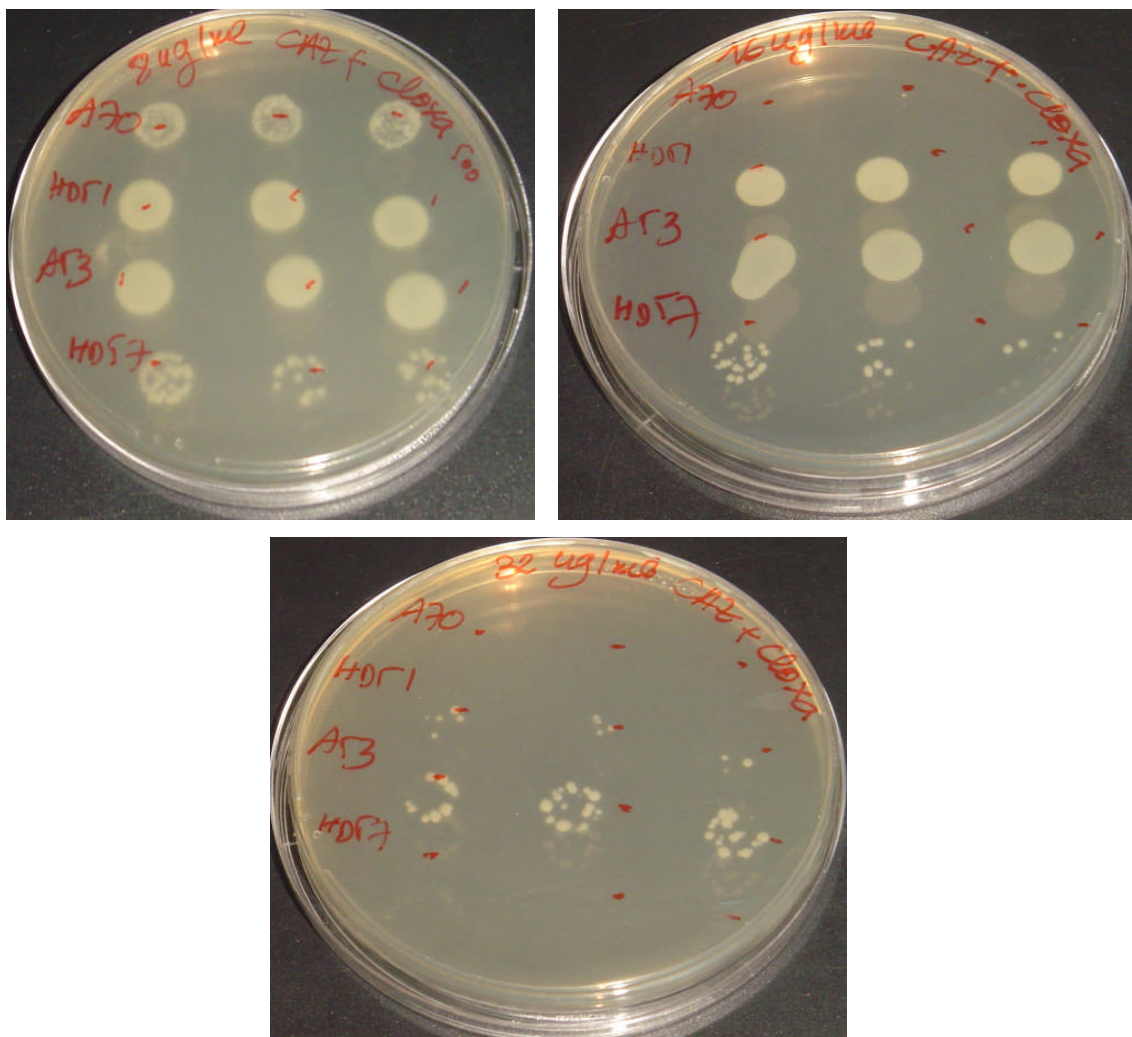


Figure 10 : Technique de la détermination des CMI sur milieu solide.

## 6.2. Détermination des CMI pour les souches d'entérobactéries résistantes à la céfoxitine

Pour les souches d'entérobactéries résistantes à la céfoxitine, la détermination des CMI pour les  $\beta$ -lactamines (CTX, CAZ, FEP, FOX) est faite en deux séries : sur MH simple et sur MH additionné de la cloxacilline. L'utilisation de cet antibiotique permet l'inhibition des céphalosporinases par lesquelles ces souches résistent à la céfoxitine.

La comparaison des CMI obtenues, sur les deux milieux, nous renseigne sur d'autres phénotypes de résistances qui peuvent coexister. Les souches sont : A10, A36, A43, A53, A62, A70, HD51, HD57 et HD40.

### \* Matériel

- Une solution mère du céfotaxime à 100 mg/ml ;
- Une solution mère de la ceftazidime à 2 mg/ml ;
- Une solution mère de la céfoxitine à 20 mg/ml ;
- Une solution mère du céfépime à 20 mg/ml ;
- Une solution mère de la cloxacilline à 20mg/ml ;
- Milieu Mueller Hinton prêt à l'emploi ou reconstitué ;

### \* Préparation des boîtes

Pour chaque antibiotique deux séries de boîtes sont préparées : une série de boîtes est préparée par la même manière citée en dessus, et une autre série additionnée de la cloxacilline à raison de 500 $\mu$ g/ml en plus de l'antibiotique à tester.

### \* Ensemencement

La même technique d'ensemencement pour la détermination de la CMI normale est utilisée également dans ce cas.

### \* Lecture

Les CMI lues sur MH sont comparées aux CMI obtenues sur MH à la cloxacilline. Toute diminution de CMI sur gélose à la cloxacilline est expliquée par la production d'une céphalosporinase.

### 6. 3. Détermination des CMI pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*

La détermination des CMI pour les souches *Acinetobacter baumannii* est réalisée en triplicata : sur MH simple, MH + cloxacilline et MH +cloxacilline + NaCl afin d'apprécier la réduction des CMI par les deux inhibiteurs.

#### \* Matériel

- Une solution mère de la ceftazidime à 2 mg/ml ;
- Une solution mère de l'aztréonam à 1mg/ml ;
- Une solution mère de l'imipénème à 320 µg/ml ;
- Une solution mère de la cloxacilline à 20mg/ml ;
- Une solution du NaCl à 0,0116 g /ml.

#### \* Préparation des boîtes

Pour chaque antibiotique, trois séries de boîtes sont préparées. La première série est constituée d'antibiotique seul, la deuxième de l'antibiotique et la cloxacilline et la dernière de l'antibiotique, la cloxacilline et le NaCl à 200mM (0,0116g/ml) (Pournaras et *al.*, 2006).

Il est à noter que la concentration de la cloxacilline est faite à 250µg/ml puis à 500µg/ml.

#### \* Lecture

Les CMI lues de chaque série sont comparées entre elles afin d'apprécier l'effet de la cloxacilline et de NaCl.

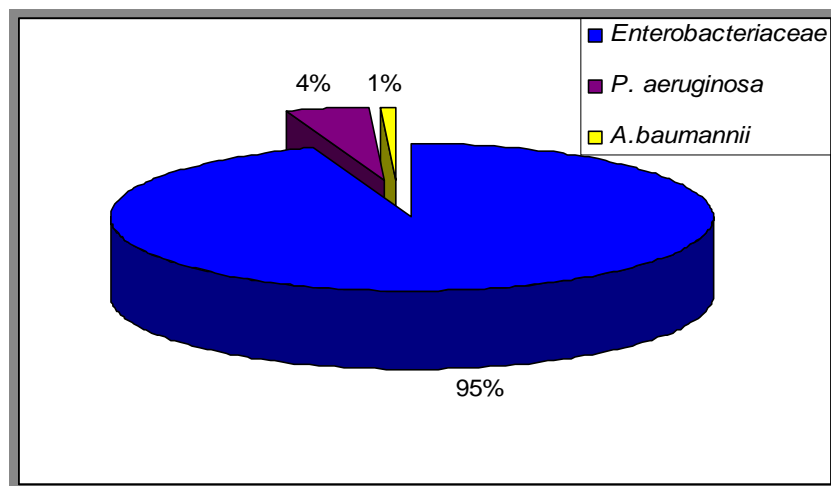
Il est noté que les poudres d'antibiotique sont dissoutes dans de l'eau distillée stérile et dans du tampon phosphate à 0,01M, pH 7.2 pour l'imipénème (**Annexe VII**).

## 7. Traitement statistique des données

Différents tests statistiques sont effectués par XL Stat 2011. 3.01. Le test de  $\chi^2$  pour la détermination des facteurs de risques, le test exact de Fisher pour donner la significativité par cases et le test  $G^2$  de wilks pour démontrer l'association entre les phénotypes de résistance aux quinolones et l'espèce bactérienne. Le test Z est employé pour la comparaison entre deux taux de résistance et entre deux taux d'infections. La différence entre les fréquences est considérée comme significative lorsque  $p \leq 5\%$ .

## I. Recueil de souches de bacilles à Gram négatif

Au cours de notre étude qui s'est déroulée pendant la période allant d'Octobre 2010 à Mai 2011 (7 mois), nous avons collecté 423 souches de bacilles à Gram négatif dont 401 souches d'*Enterobacteriaceae*, 18 *Pseudomonas aeruginosa* et 4 *Acinetobacter baumannii*. Les résultats d'identification selon les caractéristiques biochimiques sont donnés en **Annexe IX**. La répartition de ces souches collectées est donnée par la figure 11.



**Figure 11: Répartition des souches de bacilles à Gram négatif isolées des laboratoires d'analyses médicales privés.**

Il est à noter que les taux faibles d'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* seraient probablement dus au fait que ces deux germes sont incriminés le plus souvent dans les infections nosocomiales et non pas dans les infections d'origine communautaire (Mansour et *al.*, 2008).

Un taux de 53,2 % (225/423) des bacilles à Gram négatif est isolé du laboratoire d'Akbou (Ait Bachir) contre 46,8 % (198) du laboratoire de la ville de Béjaïa (Djama). Les analyses statistiques pour deux proportions n'ont pas révélé une différence significative entre le nombre de souches isolées des deux laboratoires ( $p\text{-value} > 0,05$ ).

Nous avons noté durant notre étude que la majorité des souches de bacilles à Gram négatif provient des prélèvements urinaires (92,4%) et uniquement un taux faible de souches qui provient de divers prélèvements (vaginal, coprologique, spermoculture, pus et crachat). En effet, ce résultat est expliqué par le fait que l'infection urinaire est l'une des infections communautaires les plus fréquentes notamment chez les femmes (Sekhsokh et *al.*, 2008).

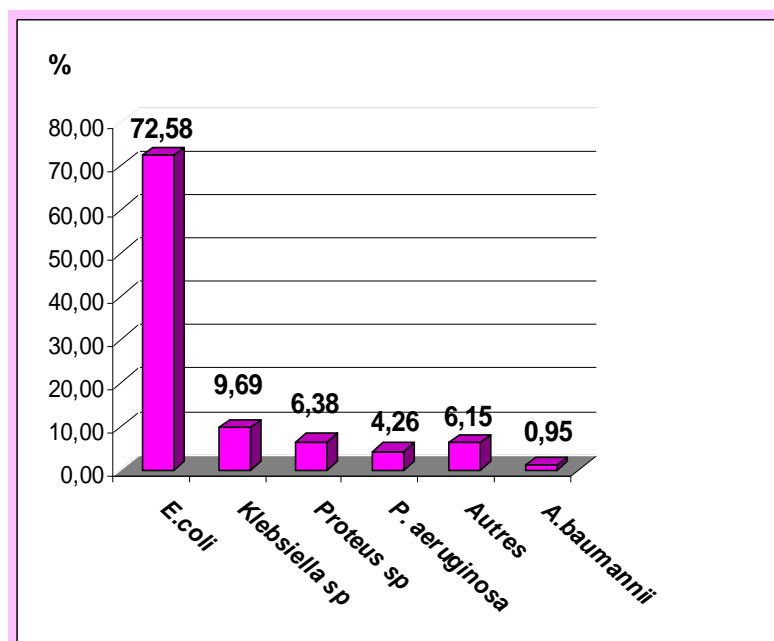
### I.1. Répartition des souches par espèces

Dans cette étude, l'espèce la plus fréquemment isolée est *E.coli* avec un taux de 72,6 % suivie par *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.* avec des taux de 9,67% et 6,38 % respectivement. Ces trois germes sont les plus incriminés dans les infections urinaires d'origine communautaire. Dans les études citées par Lavigne et coll. (2002), *E.coli* est responsable de 40 à 70 % des infections urinaires en milieu hospitalier et environ 70% en ville.

L'infection par ces germes est en rapport avec la physiologie de l'infection urinaire qui est en générale ascendante ; les germes intestinaux et périnéaux cheminent le long de l'urètre jusqu'à la vessie (Djennane et al., 2009). La colonisation intestinale par les souches d'*Enterobacteriaceae* est également un facteur de risque important dans le développement ultérieur des infections urinaires (Denton, 2007).

Pour les germes *P. aeruginosa* et *A. baumannii* qui sont des germes opportunistes incriminés dans les infections nosocomiales (Mansour et al., 2008) peuvent être transportés en médecine de ville par accident mais restent toujours d'origine hospitalière.

La répartition par espèces des souches de bacilles à Gram négatif, isolées au cours de notre étude est illustré par la figure 12. Quatre autres espèces (*Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morganii*) de la famille des *Enterobacteriaceae* sont également isolées à des taux faibles et sont réunies en une seule catégorie nommée autres.



Autres : *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* et *M.morganii*.

Figure 12: Répartition des souches de bacilles à Gram négatif isolées par espèces.

Les tests statistiques ont montré une différence significative entre le taux d'isolement de l'espèce *E.coli* et les autres espèces ( $p < 0,0001$ ), mais il n'y a pas de différence significative entre les taux d'isolement obtenus pour *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.* ( $p > 0,05$ ).

Cette différence est due au fait que *E. coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'homme. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de  $10^7$  à  $10^9$  corps bactériens par gramme de selles. La majorité des infections urinaires de la femme jeune observées en pratique médicale de ville est due à *E. coli*. Les souches provenant de la flore fécale contaminent les urines par voie ascendante (Avril et al., 1992).

Les souches de *Klebsiella sp.* et de *Proteus sp.* possèdent une uréase ce qui permet leur développement dans les urines. La dégradation de l'urée s'en suit par une élévation du pH de l'urine, ce qui altère les cellules rénales et favorise la formation de calculs (Avril et al., 1992).

*P. mirabilis* possède des pili qui en augmentant leur adhérence aux cellules épithéliales favorisent la survenue d'une pyélonéphrite ascendante. La grande mobilité des *Proteus* favorise également leur diffusion dans l'appareil urinaire (Avril et al., 1992).

## I.2. Caractéristiques de la population

### ❖ Selon le sexe

La population de laquelle nous avons isolé et identifié les 423 souches de bacilles à Gram négatif est caractérisée par une sex-ratio (Femme/homme) de 2,58 (305/118) ; 72 % (305/423) des prélèvements sont issus de patients du sexe féminin contre 28% (118/423) chez le sexe masculin. Cette répartition est illustrée par la figure 13 dessous

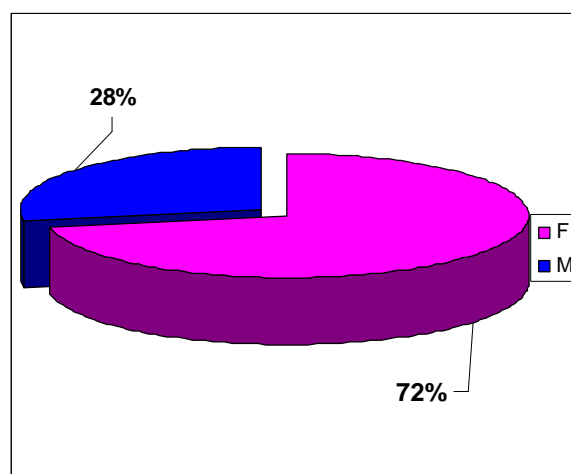


Figure 13: Répartition de la population selon le sexe.

Le test Z a démontré une différence significative entre les proportions des souches de bacilles à Gram négatif isolées chez les deux sexes au niveau de signification  $\alpha=5\%$  (p-value  $< 0,0001$ ).

Nous avons noté précédemment que 92,4 % des prélèvements est d'origine urinaire et que 72% de la population est du sexe féminin. La fréquence de ce type d'infection chez la femme est connue à cause de l'anatomie de l'appareil urinaire chez elle.

Une étude, menée en France par Haab et *coll.* (2006), a démontré que les infections urinaires sont un des principaux motifs des consultations de la femme en médecine générale, résultats d'un observatoire réalisé auprès de 7916 patientes.

### ❖ Selon l'âge

La répartition de la population par catégories d'âge est donnée par le tableau VII.

**Tableau VII : Répartition de la population selon d'âge.**

Catégories	N° F	%	N° M	%	Total	%
<2ans	16	5	28	24	44	10
>2-18 ans	43	14	18	15	61	14
>18-35 ans	118	39	13	11	131	31
>35-65 ans	77	25	29	24.57	106	25
>65	51	17	30	25.42	81	19
Total	305	100	118	100	423	100

Il est noté durant notre étude que la tranche d'âge allant de >18-35ans est la plus touchées par rapport aux autres tranches. Cette dernière est influencée par le nombre d'infections enregistré chez le sexe féminin. La répartition des souches selon l'âge des patients, illustrée par la figure 14, montre un pic correspondant à la catégorie d'âge la plus touchée par les infections, les autres catégories présentent des taux d'infections qui varient de 10 à 25%.



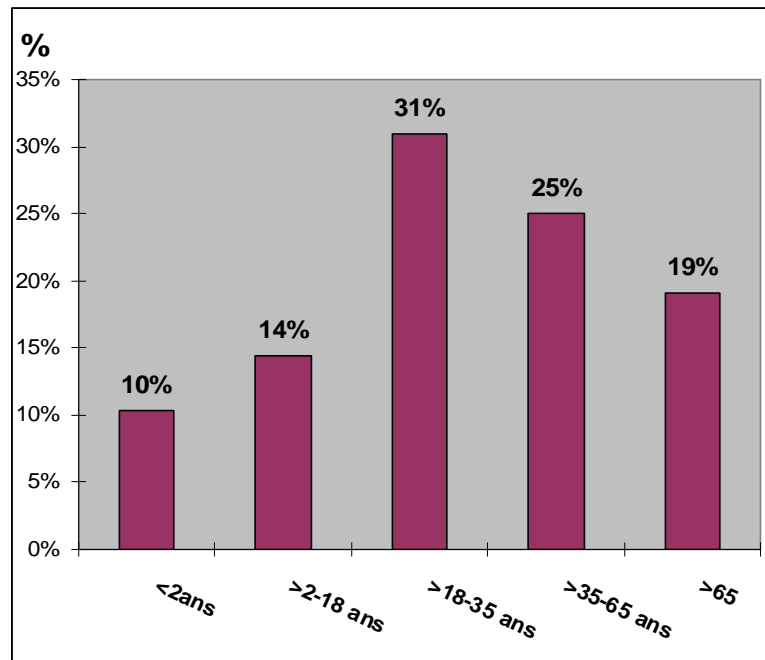


Figure 14 : Répartition des souches selon l'âge des patients.

Afin de déterminer certains facteurs de risque dans l'acquisition de souches de bacilles à Gram négatif, une répartition par catégorie d'âge et par sexe est faite comme la montre la figure 15.

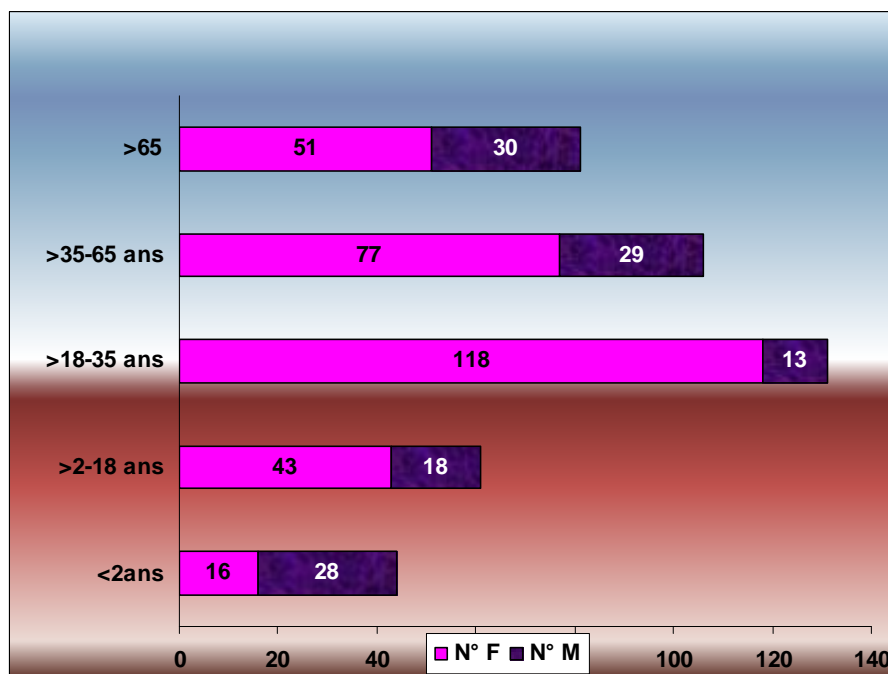


Figure 15: Répartition de la population selon l'âge et le sexe

Cette répartition montre une hétérogénéité entre les taux d'infections et les catégories d'âges, tels qu'il est très remarquable que la catégorie d'âge la plus touchée chez le sexe masculin est celle des nourrissons (<2ans). Le taux d'infection chez cette catégorie d'âge est significativement supérieur par rapport à celui noté chez celle du sexe féminin, donc le sexe masculin est un facteur de risque dans l'acquisition des infections chez les nouveaux nés.

En revanche, la catégorie la plus touchée chez le sexe féminin est celle > 18-35 ans. Le test Khi-deux montre une différence significativement supérieure à celle du sexe masculin, alors le sexe féminin est un facteur de risque chez cette catégorie d'âge. De ce fait, nous concluons que l'âge est un facteur de risque dans l'acquisition des infections à bacilles à Gram négatif.

Le tableau dessous, effectué par le test Exact de Fisher, montre les différences significatives au seuil  $\alpha=5\%$ .

**Tableau VIII : Significativité par case.**

Catégories	N° F	N° M
<2ans	<b>&lt;</b>	<b>&gt;</b>
>2-18 ans	<	>
>18-35 ans	<b>&gt;</b>	<b>&lt;</b>
>35-65 ans	<	>
>65	<b>&lt;</b>	>

*Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$*

La catégorie d'âge la plus touchée chez le sexe masculin est connue par les infections urinaires chez les enfants non circoncis. Il est connu de nos coutumes que les garçons sont, d'une manière générale, circoncis à partir de l'âge de deux ans, sauf en cas des infections urinaires récidivantes. Une étude, citée par Bréaud et Guys (2005), a démontré l'effet bénéfique de la circoncision sur les infections urinaires hautes chez l'enfant durant les premières années de vie. Cette étude a rapporté une diminution d'un dixième des taux d'infections urinaires chez les garçons circoncis (0,1%) par rapport aux garçons non circoncis (1%).

La catégorie d'âge « >18-35 » du sexe féminin, qui présente les taux d'infections les plus élevés, représente le début de la sexualité et la grossesse.

Elkharrat et coll. (2007) ont cité, parmi les facteurs de risque des infections urinaires chez la femme, les facteurs comportementaux qui sont les contraceptifs mécaniques (diaphragmes, préservatifs ou pommades spermicides) et l'activité sexuelle.

## II. Résistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*.

Durant notre étude (7 mois), 401 souches d'entérobactéries sont isolées de deux laboratoires d'analyses médicales privées. L'espèce *E.coli* est la plus isolée suivie par *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.* avec des taux de 76.5% (307), 10.22% (41) et 6.7% (27), respectivement. D'autres entérobactéries sont également isolées avec des taux très faibles.

Ces souches sont isolées majoritairement du prélèvement urinaire avec un taux de 94,01% (377/401), les autres souches (5,99%) sont issues de différents prélèvements (vaginal, spermoculture, coprologie, et pus).

La majeure partie des souches d'entérobactéries isolées (294) provient du sexe féminin avec un taux de 73,31% contre un taux de 26,69 % (107) chez le sexe masculin.

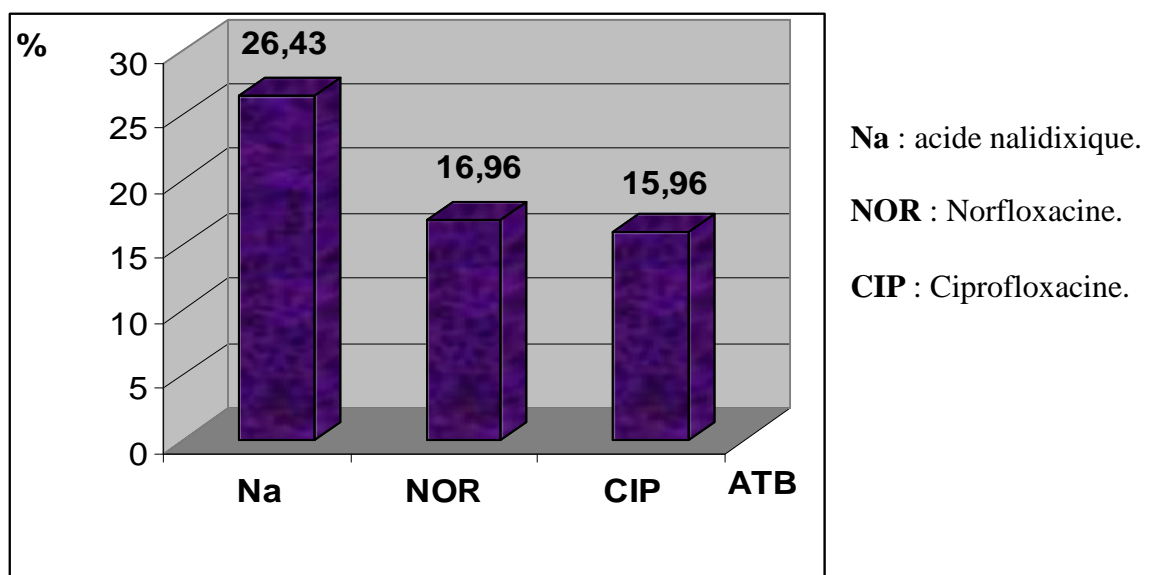
La répartition des souches d'entérobactéries par catégories d'âge (Tableau IX) montre que la catégorie d'âge la plus touchée, par les infections à entérobactéries, est la même que celle qui est touchée par les infections à bacilles à Gram négatif d'une manière générale, et cela est due au nombre important de souches d'entérobactéries isolées par rapport aux autres bactéries à Gram négatif.

**Tableau IX: Répartition des souches d'entérobactéries par catégories d'âge.**

Catégories	N° de souches	%
< 2ans	44	10,97
>2-18 ans	55	13,72
>18-35 ans	124	30,92
>35-65 ans	100	24,94
>65	78	19,45
<b>TOTAL</b>	<b>401</b>	<b>100</b>

### II.1. Résistance aux quinolones

Les souches d'entérobactéries sont naturellement sensibles à toutes les molécules des quinolones et de fluoroquinolones. Cependant, au cours de notre étude, au total 106 /401 (26,4%) souches d'entérobactéries sont résistantes à l'acide nalidixique dont 4 sont intermédiaires, 68 (16,96 %) sont résistantes à la norfloxacine dont une seule souche est intermédiaire et 64 (15,96 %) sont résistantes à la ciprofloxacine. Le reste des souches (295) sont sensibles à toutes les quinolones. Les souches résistantes aux quinolones proviennent des deux laboratoires d'analyses médicales d'une manière équitable tel que 56 sont du laboratoire Djama et 50 sont du laboratoire Ait Bachir ( $P>0.05$ ). Les proportions de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones et aux fluoroquinolones sont illustrées par la figure 16.



**Figure 16 : Proportions de résistance aux quinolones**

Comparant nos résultats à d'autres études effectuées en médecine communautaire ou hospitalière nous concluons que nos résultats sont significativement supérieurs à certains résultats obtenus par ces études et similaires à d'autres résultats. Le tableau X montre que nos résultats sont similaires aux résultats obtenus au Maroc, au Sénégal et au Bénin. Cependant, ils sont significativement supérieurs aux résultats des autres pays. Les valeurs affichées en gras sont significativement différentes de nos résultats ( $p<5\%$ ).

**Tableau X : Comparaison des taux de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries.**

Pays	Année de l'étude	% NA	% FQ 2G	Référence	P-value
Notre étude	2010-2011 (c)	26,4	15,96	Notre étude	/
Béjaïa	2007-2008 (c)	14,73	11,56	Yanat, 2009	< <b>0,0001</b>
Ain M'lila	2006-2007 (c)	11,7	10,1	Bouzenoune et <i>al.</i> , 2009	< <b>0,0001</b>
Tunisie	2002-2005 (h)	14,8	10,5	Ben abdallah et <i>al.</i> , 2008	< <b>0,0001</b>
Maroc	2008 (c)	26,52	20	Nadmi et <i>al.</i> , 2010	0,928
Bénin	2005(h)	34,92	22,45	Ahoyo et <i>al.</i> , 2007	0,056
Turquie	Depuis 2005 (c)	/	38	Mérens et Servonnet, 2010	/
Nicaragua	Depuis 2005 (c)	/	30	Mérens et Servonnet, 2010	/
France	2007(h et c)	/	14,4	Mérens et Servonnet, 2010	< <b>0,0001</b>
France	2007-2008 (c)	18	11	Fabre et <i>al.</i> , 2010	<b>0,003</b>
Sénégal	2001-2003 (c)	23,1	18,6	Dromigny et <i>al.</i> , 2005	0,376

(c) : Communautaire, (h) : hospitalière

### II.1.1. Caractéristiques de la population

#### ❖ Age

Le tableau ci-dessous donne le nombre et le taux de souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique par catégorie d'âge.

**Tableau XI : Répartition de la population par catégories d'âge.**

Catégories	N° de souches isolées	N° de souche Nal R	% Nal R
< 2ans	<b>44</b>	<b>6</b>	13,64
>2-18 ans	<b>55</b>	<b>17</b>	30,91
>18-35 ans	<b>124</b>	<b>16</b>	12,90
>35-65 ans	<b>100</b>	<b>29</b>	29,00
>65	<b>78</b>	<b>38</b>	<b>48,72</b>
Total	<b>401</b>	<b>106</b>	26,43

La catégorie d'âge la plus touchée par la résistance aux quinolones est la catégorie des personnes âgées de plus de 65 ans avec un taux de 48.72 %. Ce taux de résistance peut être

expliqué par les infections récidivantes dues au système immunitaire faible de cette tranche d'âge.

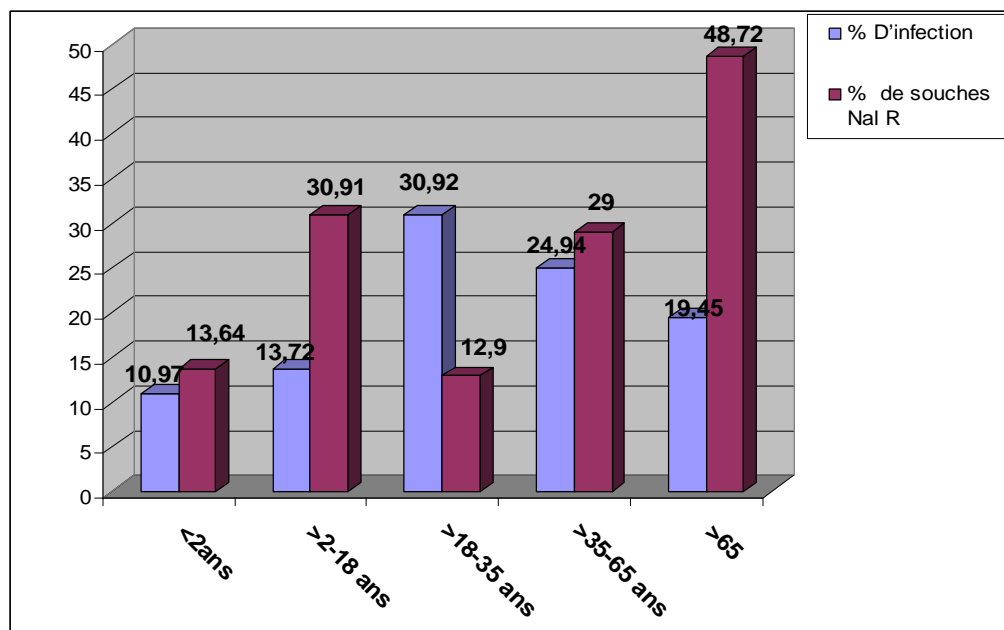
Les tests statistiques montrent que le taux de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries est lié à l'âge des patients ( $p < 0,05$ ) ; une différence significativement supérieure est observée chez la catégorie des personnes âgées.

Nos résultats sont similaires à plusieurs études menées que ce soit en communautaire ou en hospitalier. L'étude de Sotto et coll. (2006), effectuée sur des souches nosocomiales d'*E.coli*, a montré que la résistance aux quinolones est liée à l'âge avancé (>65ans).

Selon Raymond et coll. (2011), les sujets âgés, fragiles, sont particulièrement sensibles aux infections, voire aux surinfections. Un certain nombre de caractéristiques tel que le déclin fonctionnel, la polypathologie, la polymédication, la dénutrition, modifient la présentation cliniques des infections. De ce fait, le diagnostic clinique est retardé et contribuant ainsi à la gravité des tableaux cliniques. L'antibiothérapie précoce est généralement probabiliste dans l'attente de l'isolement du germe responsable.

De Moüy et coll.(2001) ont cité parmi les facteurs de risque, de l'acquisition des souches résistantes à l'acide nalidixique en communautaire, l'âge avancé de plus de 65 ans.

Les proportions de résistance et les taux d'infection par catégories d'âges présentent une hétérogénéité très remarquable entre le nombre de souches d'entérobactéries isolé, de chaque catégorie, et le nombre de souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique. La figure 17 compare entre les taux d'infection et de résistance enregistrés dans chaque catégorie d'âge.



**Figure 17 : Comparaison des taux d'infection par les souches d'entérobactéries et les taux de résistance à l'acide nalidixique par catégories d'âge.**

## ❖ Sexe

Sur le total des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique (106/401), 68 souches sont isolées des patients du sexe féminin et 38/106 du sexe masculin.

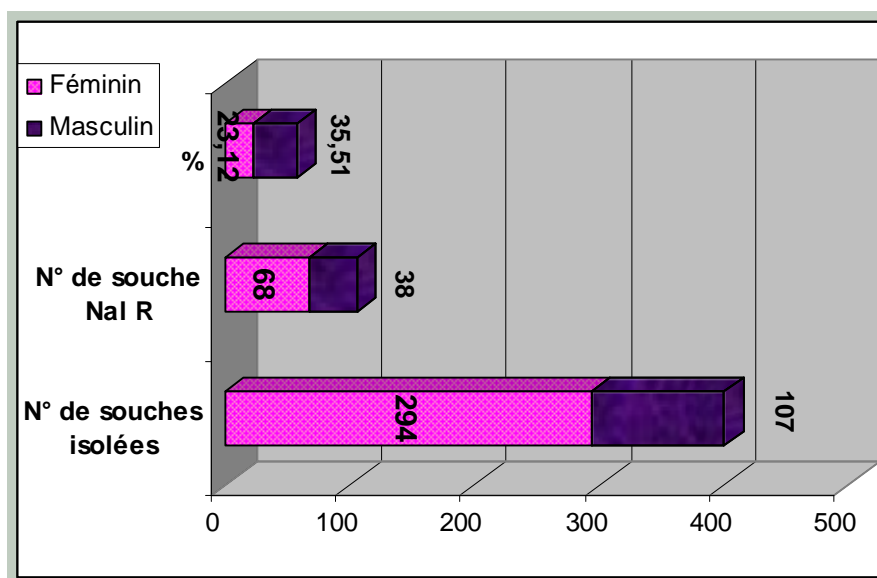
Les proportions de résistance chez le sexe féminin et le sexe masculin sont respectivement 23,12% (68/294) et 35,51% (38/107). Les proportions de résistance chez les deux sexes sont présentées par le tableau XII.

**Tableau XII : Proportions de souches d'entérobactéries Nal R par sexe.**

Sexe	N° de souches sensibles	N° de souche Nal R	Total	%
Féminin	226	68	294	23,12
Masculin	69	38	107	35,51
Total	295	106	401	26,43

*NalR : Résistantes à l'acide nalidixique*

La figure 18 montre que plus d'un tiers (1/2,81) des souches d'entérobactéries isolées du sexe masculin sont résistantes à l'acide nalidixique comparant à la résistance observée chez le sexe féminin qui est moins d'un quart de la population féminine (1/4,23).



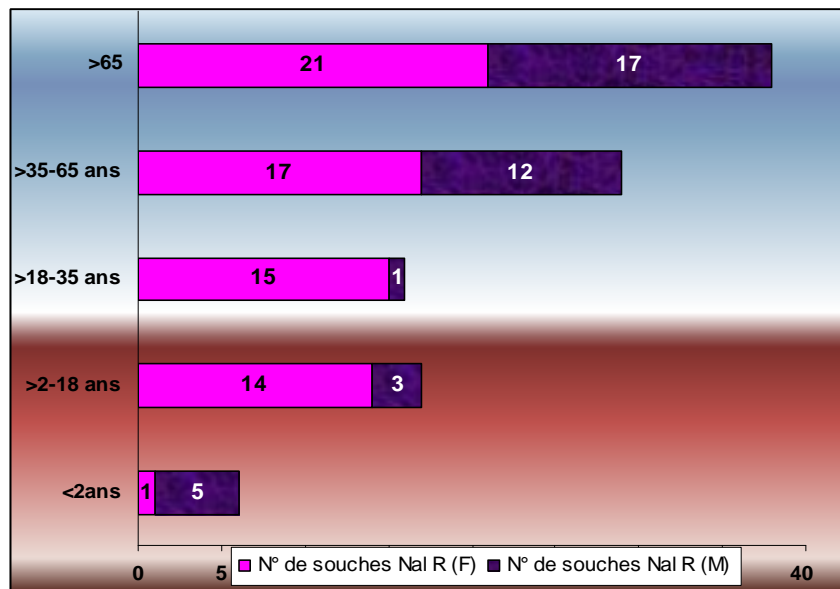
**Figure 18 : Proportion des souches d'entérobactéries Nal R par sexe**

Le test de Khi-deux a montré une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre le taux de résistance observé chez le sexe masculin et le sexe féminin tel que le taux de résistance chez le sexe masculin est significativement supérieur à celui du sexe féminin. De ce fait, nous

concluons que le sexe masculin est un facteur de risque dans l'acquisition des souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones.

#### ❖ Sexe et catégories d'âge

La figure 19 illustre la répartition des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique par catégories d'âge et par sexe.



**Figure 19 : Répartition des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique par catégories d'âge et par**

Nous avons remarqué durant notre étude que la catégorie d'âge « >65ans » des deux sexes présente la proportion de résistance la plus élevée comparée aux autres catégories d'âges. La catégorie d'âge « < 2ans » du sexe féminin et celle de >18-35 ans du sexe masculin ont présenté les taux de résistance les plus faibles aux quinolones. Le test statistique (Chi-deux) a montré des différences significatives au seuil de signification 5%. De ce fait, l'âge avancé plus de 65 ans est un facteur de risque d'acquisition de souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones. Le test exact de Fisher montre les différences significatives au seuil de signification 5% (Tableau XIII).



**Tableau XIII: Significativité par case :**

Catégories	N° de souches sensibles (F)	N° de souches Nal R (F)	N° de souches sensibles (M)	N° de souches Nal R (M)
<2ans	<	<	>	>
>2-18 ans	<	>	>	<
>18-35 ans	>	<	<	<
>35-65 ans	>	>	<	>
>65	<	>	<	>

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ .

Nal R : résistantes à l'acide nalidixique.

Nos résultats se concordent avec les résultats rapportés par la littérature. Les facteurs de risque, d'acquisitions de souches résistantes aux quinolones dans les infections urinaires communautaires, cités par De Moüy et coll. (2001) et Nseir et coll.(2005) sont : antécédent de sondage urinaires au cours des sept derniers jours, antécédent d'infection urinaire durant les six mois précédents, traitement récent par FQ, traitement récent par aminosides, le sexe masculin, enfants et sujets âgés de plus de 65 ans.

Néanmoins, d'autres études ne classent pas le sexe et l'âge comme facteurs de risque dans l'acquisition de souches résistantes aux FQ ; des différences non significatives ont été trouvées ( $P>0.05$ ) par Dromigny et coll. (2005) et Nicoletti et coll. (2010).

Cette différence entre les facteurs de risque est probablement due à la différence des populations étudiées.

### II .1.2. Répartition des souches Nal R par type de prélèvement

Le tableau XIV exprime la répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones par type de prélèvement.

**Tableau XIV: Répartition des souches Nal R par type de prélèvement.**

Origine	Urines	Autres	Total
Nombre total de souches sensibles	280	15	294
Nombre de souches résistantes	97	9	106
Total	377	24	401
%	25,73	37,50	26,43

Autres : PV, SPC, Pus et cop.

Les souches d'entérobactéries isolées du prélèvement urinaire présentent le taux de résistance de **25,73%** comparé aux autres prélèvements regroupés en une seule catégorie nommée autres. Le test de Khi-deux ne montre pas un lien entre le nombre de souches résistantes et le type de prélèvement. Cela est probablement dû à l'effectif des autres prélèvements qui est faible.

Le tableau ci-dessus montre que la plupart des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique proviennent du prélèvement urinaire ( $P < 0,0001$ ). Ce résultat peut être expliqué par le fait que les quinolones sont le traitement de choix des infections urinaires communautaires et au fait qu'elles sont éliminées par voie urinaire (Lastours et Fantin, 2010). Selon Mérens et Servonnet (2010), les quinolones sont le premier choix des antibiothérapies probabilistes des infections urinaires communautaires.

### II .1.3. Répartition des souches Nal R par espèces

La répartition des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique par espèces est figurée par le tableau XV.

**Tableau XV : Répartition des souches d'entérobactéries Nal R par espèces.**

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>Autres</i>	<i>Total</i>
<b>Nombre de souches sensibles</b>	<b>225</b>	<b>30</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	<b>295</b>
<b>Nombre de souches résistantes</b>	<b>82</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>106</b>
<b>Nombre total de souches isolées</b>	<b>307</b>	<b>41</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>401</b>
<b>%</b>	<b>26,71</b>	<b>26,82</b>	<b>18,51</b>	<b>30,76</b>	<b>26,43</b>

Autres : *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morganii*

Les taux de résistance les plus élevés aux quinolones sont notés chez *Klebsiella sp.* (**26,82%**) et *E.coli* (**26,71 %**) suivies par *Proteus sp.* avec un taux de **18,51 %**. Cependant, le test de Khi-deux ne montre pas une association entre le nombre de souches résistantes à l'acide nalidixique et les espèces isolées. Les autres espèces (*Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morganii*) présentent en tout un taux de résistance de **30,76%**.

Nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Bouzenoune et coll.( 2009). Leur étude s'est portée sur 239 bactéries isolées des urines et les entérobactéries ont présenté 87%

des bactéries isolées. Cependant, le taux de résistance observé chez nos souches d'*E.coli* est significativement supérieur au taux observé durant leur étude ( $P < 5\%$ ).

Le tableau XVI compare entre les taux de résistance, à l'acide nalidixique, des souches d'entérobactéries isolées durant notre étude et les autres études.

**Tableau XVI: Comparaison des taux de résistance aux quinolones par espèces.**

Pays	An d'étude	% <i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i> <i>sp.</i>	<i>Proteus</i> <i>sp.</i>	Référence	P-value
Notre étude	2010-11 (c)	26,71	26,82	18,51	Notre étude	/
Béjaïa	2007-2008 (c)	<b>14,6</b>	14,03	16,66	Yannat, 2009	<b>&lt; 0,0001</b>
Ain M'lila	2006-2007 (c)	<b>11,7</b>	15,8	9,1	Bouzenoune et al., 2009.	<b>&lt; 0,0001</b>
Niger	2006-2007 (h)	63,3	60,4	4	Akujobi et Ewuru, 2010	/

#### II .1.4. Phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones.

Les phénotypes de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries sont déterminés selon la sensibilité ou la résistance à 3 antibiotiques : NA, NOR et la CIP (Tableau XVII) selon Soussy et coll. (2006).

**Tableau XVII: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (Soussy, 2006).**

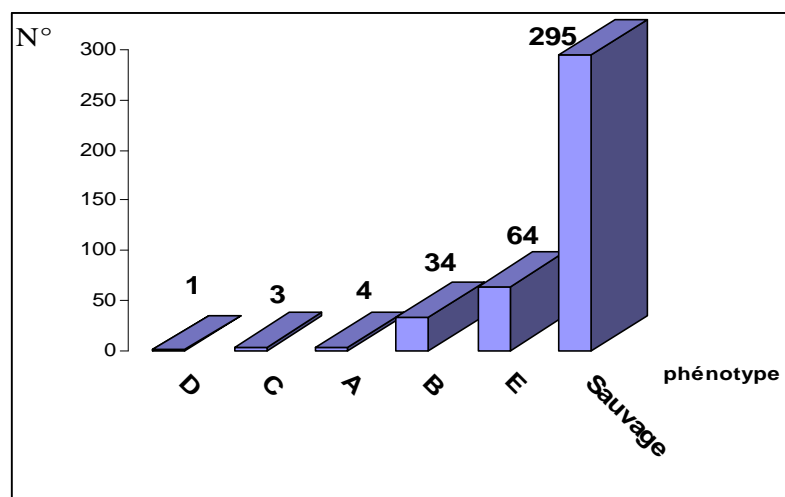
Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones			
NA	NOR	CIP	Mécanisme Probable
S	S	S	Sauvage
I	S	S	Réduction d'accumulation ou <i>qnr</i> (A)
R	S	S	1 mutation <i>gyrA</i> (B)
R	I	S	1 mutation <i>gyrA</i> (B)
R	R	S	1 mutation <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i> (C)
R	R	I	2 mutations <i>gyrA</i> + 1mutation <i>parC</i> (D)
R	R	R	2 mutations <i>gyrA</i> + 1mutation <i>parC</i> +- perméabilité (E)

La détermination phénotypique des mécanismes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones, faite selon Soussy et *coll.* (2006), a révélé que 73,56 % (295) des souches sont de phénotype sauvage, 15,96% sont de phénotypes E (2 mutations *gyrA*+1mutation *parC* +- perméabilité) suivie par le phénotype B (1 mutation *gyrA*) avec un taux de 8,47%. Les autres phénotypes ont des taux faibles tel que  $\approx$  1% des souches sont probablement porteuses de gène *qnr*. La prévalence des phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones est donnée par le tableau XVIII.

**Tableau XVIII : Prévalence des phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones.**

Phénotype	N°	%
C	3	0,74
A	4	0,99
B	34	8,47
D	1	0,24
E	64	15,96
Sauvage	295	73,56
Total	401	100

Les différents phénotypes de résistance aux quinolones observées chez nos souches sont figurés par la figure 20.



**Figure 20 : Phénotypes de résistance aux quinolones.**

## ❖ Répartition des phénotypes de résistance aux quinolones par espèces.

La répartition des phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones est figurée par le tableau dessous.

**Tableau XIX : Répartition des phénotypes de résistance aux quinolones par espèces.**

	A	B	C	D	E	Sauvage	Total
<i>E.coli</i>	2	27	3	1	49	225	307
<i>Klebsiella sp.</i>	0	3	0	0	8	30	41
<i>Proteus sp.</i>	1	3	0	0	1	22	27
<i>Autres</i>	1	1	0	0	6	18	26
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>295</b>	<b>401</b>

Autres : *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morganii*

Nous avons observé au cours de notre étude que le phénotype de résistance le plus dominant chez *E.coli* est le phénotype (E): 2 mutations *gyrA*+1mutation *parC* +- perméabilité suivie par les phénotypes (B) et (C) respectivement : 1 mutation *gyrA* et 1 mutation *gyrA*+ 1 mutation *parC*. Ces phénotypes de résistance reflètent le nombre de mutations observées chez cette souche. Il est connu par exemple que la fréquence de mutation à la rifampicine ou aux quinolones est assez élevée, de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  (Skurnik et Andremont, 2006).

Étant donné qu'*E.coli* est une souche intestinale, le nombre de mutations est probablement dû à la pression de sélection au cours de l'antibiothérapie par les quinolones.

Skurnik et Andremont (2006) ont Schématisé la résistance aux quinolones puis aux fluoroquinolones de générations successives dans un processus qui se déroule par accumulation de mutations les unes après les autres.

Chez les autres espèces, tous les phénotypes de résistance présentent des taux faibles, avec la dominance de phénotype (E) dans la plupart des cas.

Cependant, les tests statistiques d'indépendance ( $G^2$  de wilks) ne montrent pas une association entre les phénotypes de résistance des souches d'entérobactéries aux quinolones et les espèces de cette famille ( $p>0,05$ ).

**II .1.5. CMI des souches d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine.**

Au cours de cette étude, nous avons obtenu 64 souches d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine, les CMI de 15 souches ont été déterminées par rapport à cet antibiotique. Les CMI obtenues ainsi que l'interprétation en sensibles(S), Intermédiaire (I) ou Résistant figurent dans le tableau XX. Nous avons remarqué, au cours de notre étude, des CMI très élevées pour la ciprofloxacine. Les CMI élevées pour la ciprofloxacine nous indiquent sur le nombre de mutations présentes chez les souches d'entérobactéries résistantes à cet antibiotique ainsi que la coexistence de différents mécanismes de résistance.

Tableau XX : CMI des souches d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine.

Code	SOUCHES	Φ à CIP	CIP 2µg/ml	4	8	16	32	64	128	CMI µg/ml	S/I/R S≤0,5<I<1<R
A10	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	-	-	<b>64</b>	<b>R</b>
A100	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	+	-	<b>128</b>	<b>R</b>
A102	<i>K. pneumoniae</i>	<b>16</b>	+	-	-	-	-	-	-	<b>4</b>	<b>R</b>
A35	<i>K. pneumoniae</i>	<b>19</b>	+	-	-	-	-	-	-	<b>4</b>	<b>R</b>
A36	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	+	-	<b>128</b>	<b>R</b>
A37	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	-	-	-	<b>32</b>	<b>R</b>
A43	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	-	-	<b>64</b>	<b>R</b>
A53	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	-	-	<b>64</b>	<b>R</b>
A61	<i>K. pneumoniae</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	-	-	<b>64</b>	<b>R</b>
A62	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	-	-	<b>64</b>	<b>R</b>
A70	<i>K.pneumoniae</i>	<b>6</b>	+	-	-	-	-	-	-	<b>4</b>	<b>R</b>
A99	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	+	-	<b>128</b>	<b>R</b>
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	<b>10</b>	+	+	+	+	-	-	-	<b>32</b>	<b>R</b>
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	-	-	-	<b>32</b>	<b>R</b>
HD40	<i>E.coli</i>	<b>6</b>	+	+	+	+	+	+	-	<b>128</b>	<b>R</b>

CIP R : résistant à la ciprofloxacine.

### ➤ Discussion des phénotypes de résistance

Les souches d'*E.coli*, isolées durant notre étude, sont principalement du phénotype (B) et (E) ((B) : 1 mutation *gyrA*, (E): 2 mutations *gyrA*+1mutation *parC* +- perméabilité). Chez cette souche, une simple mutation dans le gène *gyrA* peut être suffisante pour causer de haut niveau de résistance à l'acide nalidixique. Cependant, une deuxième mutation au niveau du même gène et/ou des gènes de la topoisomérase IV est requise pour avoir des niveaux de résistance élevés aux FQ (Hopkins et *al.*, 2005).

Chez les isolats cliniques d'*E.coli*, les mutations au niveau du gène *gyrA* sont plus prévalentes que les mutations du gène *gyrB* même chez les souches de haut niveau de résistance aux FQ. Les mutations du gène *gyrA* confèrent des résistances de haut niveau aux quinolones (CMI de l'acide nalidixique de 200 à >400µg/ml) comparant à celles du gène *gyrB* (100µg/ml) (Hopkins et *al.*, 2005).

Les substitutions nucléotidiques au niveau du codon 83 sont les mutations les plus fréquentes du gène *gyrA* chez les isolats cliniques ou vétérinaires des souches d'*E.coli*. Ce résidu Serine est substitué, le plus souvent, par la leucine. Une substitution additionnelle Asp87Asn est associée aux souches de résistance modérément élevée aux FQ. Néanmoins, les souches ayant une seule mutation au niveau de Ser83 sont significativement plus résistantes aux quinolones que celles ayant une seule mutation au niveau de codon Asp87 (Hopkins et *al.*, 2005).

Dans notre étude, 27/82 des souches d'*E.coli* résistantes à l'acide nalidixique sont porteuses d'une mutation, au minimum, au niveau du gène *gyrA* ; cette mutation est probablement une substitution Ser83Leu.

Des études ont montré que seules les souches ayant des CMI  $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$  à la ciprofloxacine (intermédiaire à résistant) sont porteuses d'une mutation au niveau du gène *parC*. Had et *coll.* ont trouvé que toutes les souches d'*E.coli*, ayant des CMI  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  à la ciprofloxacine, sont porteuses de mutations au niveau du codon Ser80 et /ou Glu84 en plus d'une mutation, au minimum, au niveau du gène *gyrA*. Les mutations au niveau du codon 80 sont les plus identifiées et la substitution Ser80Ile devient la plus commune (Hopkins et *al.*, 2005).

49/82 souches d'*E.coli* sont de haut niveau de résistance aux FQ, ce qui suggère la présence de deux mutations au niveau du gène *gyrA* plus une mutation au niveau du gène *parC*.

La résistance de haut niveau aux FQ des souches d'*E.coli* est souvent associée à plusieurs mutations de la région QRDR des gènes de topoisomérase. Cependant, ces



mutations ne peuvent pas être seules responsables du phénotype de résistance de ces souches ce qui suggère la présence d'autres mécanismes de résistance diminuant l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique (Hopkins et al., 2005).

La résistance aux quinolones due au phénotype MAR (Multiple Antimicrobial Resistance) est souvent associée à une corésistance aux autres antibiotiques des autres familles (Hopkins et al., 2005)

Les gènes chromosomiques *marRAB* contrôlent les niveaux d'expression d'OmpF et certaines pompes d'efflux chez les souches d'*E.coli*. Les mutations affectant MarR induisent l'expression constitutive de cet opéron et conduisent ainsi au développement des phénotypes de multirésistance (Ruiz, 2003).

Les souches A10, A36, A43, A99, A100 et HD40 ayant des CMI  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$  pour la ciprofloxacine sont probablement de ce phénotype, car elles exhibent des CMI très élevées même à d'autres antibiotiques tels que le céfotaxime, l'aztréonam et des CMI modérément élevées à la gentamicine (16, 64  $\mu\text{g/ml}$ ).

Un autre phénotype de résistance aux quinolones est probablement présent chez certaines souches d'*E.coli* résistantes aux quinolones, c'est la résistance plasmidique. Les plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones (PMQR) sont rapportés pour la première fois en 1987, le plasmide pMG252 est décrit en 1994 chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* (Mammeri et al., 2005 ; Jacoby et al., 2006).

Le niveau basal de la résistance aux FQ, fournis par le plasmide pMG252, est faible et les souches porteuses du gène *qnr* peuvent apparaître sensibles aux FQ. Cependant, le nombre de mutations spontanées est 100 fois supérieur chez les souches d'*E.coli* J53 porteuses du plasmide pMG252. Le gène *qnr* peut également compléter d'autres mécanismes de résistance. Le même plasmide peut conférer une résistance à l'aztréonam, ceftazidime, céfotaxime, céfoxitine,... et la gentamicine (Hopkins et al., 2005 ; Nordmann et Mammeri, 2007) ce qui est le cas pour les souches A10, A36, A43, A99, A100 et HD40.

La détermination phénotypique des mécanismes de résistance aux quinolones a montré que deux souches d'*E.coli* (A52, DD51) sont du phénotype (A), donc elles peuvent être porteuses du gène *qnr*. Ces souches sont sensibles à tous les autres antibiotiques ce qui exclu vraisemblablement le phénotype de la réduction d'accumulation.

Parmi les souches pour lesquelles les CMI sont effectuées, les souches BLSE positives sont les souches A37, A99, A100 et HD40. Nordmann et Mammeri (2007) ont rapporté une fréquente association entre les déterminants de type Qnr et les  $\beta$ -lactamases à spectre élargie,

ce qui signifie la possibilité d'une co-sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidique.

## II.2. Résistance aux $\beta$ -lactamines

### 1.1. Résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G)

Au cours de notre étude, 34 souches d'entérobactéries sont résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (8.47%). Les résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches résistantes à ces deux antibiotiques sont donnés par le tableau XXI.

**Tableau XXI : Diamètres et profils de résistance au CTX et CAZ.**

Code	SOUCHE	Ø mm	CTX	Ø mm	CAZ	CD UNI	SOUCHE	Ø mm	CTX	Ø mm	CAZ
A93	<i>Proteus sp.</i>	6	R	8	R	A91	<i>E.coli</i>	8	R	20	I
A98	<i>M.morganii</i>	8	R	16	R	A89	<i>E.coli</i>	6	R	16	S
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	6	R	15	R	A62	<i>E.coli</i>	10	R	14	R
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	6	R	6	R	A53	<i>E.coli</i>	8	R	8	R
A101	<i>Klebsiella sp.</i>	6	R	6	I	A36	<i>E.coli</i>	6	R	6	R
HD31	<i>Citrobacter sp.</i>	16	R	13	R	A37	<i>E.coli</i>	28	S	18	R
A35	<i>Klebsiella sp.</i>	15	R	20	I						
HD57	<i>Citrobacter sp.</i>	8	R	14	R						
A102	<i>Klebsiella sp.</i>	6	R	18	R						
A70	<i>Klebsiella sp.</i>	8	R	9	R						
A43	<i>E.coli</i>	15	R	10	R						
A61	<i>Klebsiella sp.</i>	6	R	6	R						
A84	<i>E.coli</i>	6	R	6	R						
A60	<i>Klebsiella sp.</i>	6	R	6	R						
A99	<i>E.coli</i>	6	R	15	R						
A55	<i>Klebsiella sp.</i>	13	R	15	R						
A40	<i>Klebsiella sp.</i>	14	R	20	I						
HD51	<i>Klebsiella sp.</i>	6	R	6	R						
DD17	<i>E.coli</i>	20	R	30	S						
A06	<i>E.coli</i>	20	R	28	S						
HD56	<i>E.coli</i>	14	R	20	I						
A10	<i>E.coli</i>	16	R	6	R						
HD54	<i>E.coli</i>	6	R	28	S						
HD49	<i>E.coli</i>	15	R	19	I						
HD40	<i>E.coli</i>	6	R	10	R						
HD38	<i>E.coli</i>	15	R	23	S						
HD27	<i>E.coli</i>	11	R	22	S						
A100	<i>E.coli</i>	18	R	16	R						

CTX: S  $\geq$  26; R < 23/ CAZ: S  $\geq$  21; R < 19

Le taux de résistance, des souches d'entérobactéries, aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est donc de **8.47%**.

Sur les 34 souches, il y a 32 souches qui sont d'origine du prélèvement urinaire, une d'origine du prélèvement de pus et l'autre de la selle. Le test pour deux proportions a montré une différence significative entre le prélèvement des urines et les autres prélèvements ( $p < 0.0001$ ). Le taux élevé de la résistance aux céphalosporines est probablement dû aux échecs thérapeutiques des traitements probabilistes sans antibiogramme des infections urinaires tel qu'il est le cas pour les quinolones (Mérens et Servonnet, 2010) et le portage digestif de souches résistance aux C3G (Ruppé, 2010).

### 2.1.1. Caractéristiques de la population

#### ❖ Sexe

24 des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont d'origine des patients du sexe masculin contre 10/34 qui sont isolées chez le sexe féminin. La comparaison des deux proportions a montré une différence hautement significative entre les taux de résistance observés chez les deux sexes ( $p < 0,0001$ ). Donc, le sexe masculin est un facteur de risque dans l'acquisition des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Le tableau XXII montre le nombre de souches isolées ainsi que le nombre de souches résistantes chez les deux sexes.

**Tableau XXII : Taux de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération par sexe.**

Sexe	N° de souches sensibles	N° de souches C3GR	Total	%
Féminin	284	10	294	3,4
Masculin	83	24	107	22,42
<b>Total</b>	367	34	401	<b>8.47</b>

C3G R : résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

#### ❖ Age

La répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âge a montré que les catégories d'âge les plus touchées sont la catégorie des nourrissons et la catégorie des personnes âgées >65 ans. La résistance chez ces deux catégories est probablement expliquée par l'acquisition à l'hôpital de souches résistantes aux C3G.

Le tableau ci-dessous donne le nombre et le taux de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âge.

**Tableau XXIII: Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âge.**

Catégories	N° de souches C3G R	N° de souches sensibles	N° Total
<2ans	13	31	<b>44</b>
>2-18 ans	3	52	<b>55</b>
>18-35 ans	2	120	<b>122</b>
>35-65 ans	3	97	<b>100</b>
>65	13	67	<b>80</b>
Total	34	367	401

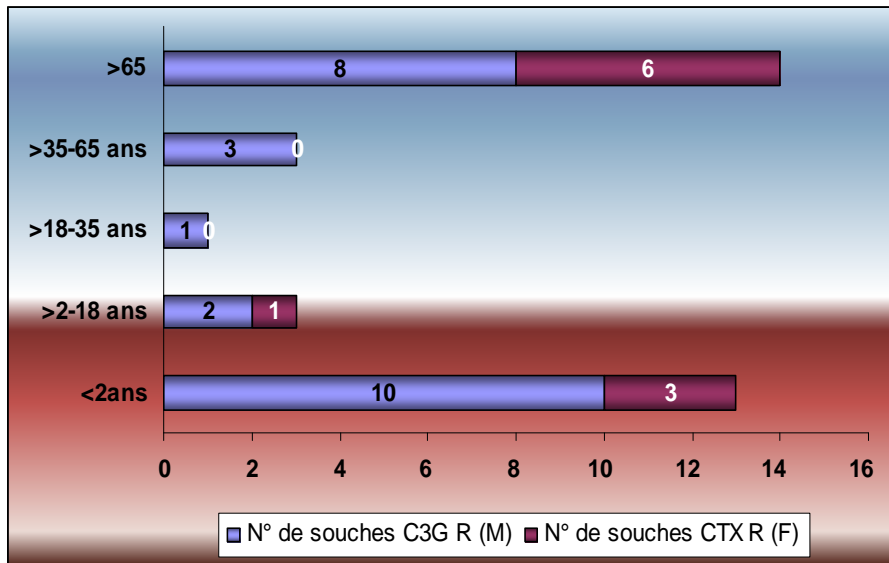
Les tests statistiques ont montré une association entre le nombre de souches résistantes aux C3G et l'âge des patients ( $p < 0,0001$ ). Le test exact de Fisher montre la significativité par case (Tableau XXIV).

**Tableau XXIV: Significativité par cases.**

	N° de souches C3G R	N° de souches sensibles
<2ans	<b>&gt;</b>	<b>&lt;</b>
>2-18 ans	<	>
>18-35 ans	<b>&gt;</b>	<b>&lt;</b>
>35-65 ans	<b>&gt;</b>	<b>&lt;</b>
>65	<b>&gt;</b>	<b>&lt;</b>

*Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$*

Le taux de résistance chez les catégories <2ans et >65 ans est significativement supérieur à ceux des autres catégories. De ce fait, l'âge est un facteur de risque dans l'acquisition de souches d'entérobactéries résistantes aux C3G. Cependant, nous notons d'après la répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âges (figure 21) que la catégorie d'âge <2ans du sexe masculin est la catégorie d'âge la plus touchée des deux sexes.



**Figure 21 : répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par catégories d'âges.**

Les tests statistiques ont montré que le taux de résistance aux C3G, chez cette catégorie du sexe masculin, est significativement supérieur aux taux observés chez les autres catégories d'âges des deux sexes. Le test exact de Fisher (Tableau XXV) montre la significativité par case au seuil  $\alpha=5\%$ .

**Tableau XXV : Significativité par case.**

Catégories	N° de souches sensibles (M)	N° de souches C3G R (M)	N° de souches sensibles (F)	N° de souches CTX R (F)
<2ans	<	>	>	>
>2-18 ans	>	<	>	<
>18-35 ans	>	<	<	<
>35-65 ans	>	<	>	<
>65	<	>	>	>

*Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$*

### 2.1.2. Répartition des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G par espèces.

Au cours de cette étude, les souches d'entérobactéries isolées résistantes aux C3G appartiennent majoritairement à l'espèce *E.coli* (19/34), suivie par *Klebsiella sp.* (9/34). Les autres souches appartiennent aux genres *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, et *M. morganii* par 1, 4, 1 souches, respectivement. Le tableau dessous donne la répartition des souches résistance aux C3G par espèces.

**Tableau XXVI : Répartition des souches résistantes aux C3G par espèces.**

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>	Autres	Total
N° de souches sensibles	288	32	26	21	367
<b>N° de souches C3G R</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>34</b>
Total	307	41	27	26	401
% de résistance	6.18	21.95	3.7	19.23	8.47

Autres : *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morganii*

C3G R : résistantes aux céphalosporines de 3ème génération.

Les tests statistiques ont montré une association entre le nombre de souches résistantes aux C3G et l'espèce bactérienne ( $p < 0,05$ ). Le test exact de Fisher (Tableau XXVII) montre que le taux de résistance aux C3G est significativement supérieur chez *Klebsiella sp.*

**Tableau XXVII: Significativité par case.**

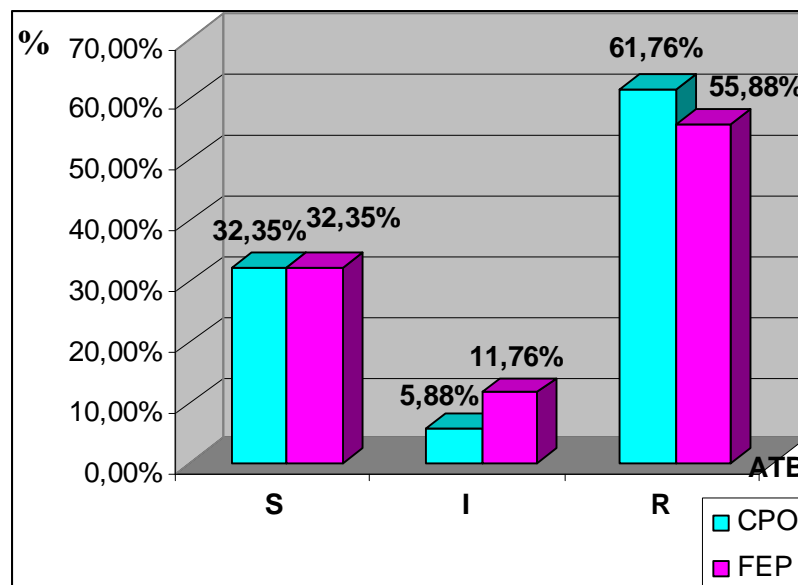
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>	Autres
N° de souches sensibles	>	<	>	<
N° de souches C3G R	<	>	<	>

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$

Le taux de résistance aux C3G est plus élevé chez *Klebsiella sp.* est probablement dû au fait que cette souche est productrice des enzymes inactivant les C3G tel que les BLSE et les céphalosporinases.

### 1.2. Résistance aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération (C4G)

La figure 22 illustre les taux de résistance aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.



**Figure 22: Taux de résistance aux C4G.**

S: sensible ; I: intermédiaire, R: résistant.

CPO : cefpirome ; FEP: Cefépime.

C4G : céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération.

Sur 34 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, nous avons 23/34 souches résistantes au cefpirome dont deux sont intermédiaires au même antibiotique et 23/ 34 résistantes au céfépime dont 4 sont intermédiaires. Le taux de résistance des souches d'entérobactéries aux C4G est de 5,73%.

Comparant nos résultats avec ceux des autres études, nous avons remarqué que le taux de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération chez nos souches d'entérobactéries reste inférieur aux résultats rapportés par d'autres études menées en Algérie, en Tunisie, en Europe et dans des pays Asiatiques. Il est significativement inférieur au taux rapporté au Bénin en 2007, mais supérieur au taux rapporté en Australie. Le tableau XXVIII reprend les éléments de cette comparaison.

**Tableau XXVIII : Comparaison des taux de résistance aux C3G avec d'autres taux rapportés par la littérature.**

Pays	Année d'étude	C3G	C4G	P valeur	Référence
<i>Nos résultats</i> (n=401)	2010-2011 (c)	8,47	5,73		
Algérie	/	25,7	/	?	Mkaouar et al., 2008
Bénin	2005 (h)	<b>47,08</b>	/	<0,05	Ahoyo et al., 2007
Tunisie	1999-2005 (h et c)	<b>15</b>	/	<0,05	
Australie	/	2	/	?	
Inde	/	34	/	?	Mkaouar et al., 2008
Chine	/	32	/	?	
Europe	1997	23		?	
	2003	13	/	?	

H : hospitalier, c : communautaire, ?: Non déterminée

### 1.3. Résistances aux autres $\beta$ -lactamines

Les souches d'entérobactéries collectées durant notre étude ont présenté des taux de résistance variables à d'autres antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. Les taux de résistance les plus élevés sont notés chez les souches de d'*E.coli* et *Klebsiella sp.* à l'amoxicilline et l'association amoxicilline-acide clavulanique. Des taux de 70.35% et 65.47% sont observés, pour ces deux antibiotiques respectivement, chez les souches d'*E.coli* et un taux de 78.04 % chez les souches de *Klebsiella sp.* pour l'association amoxicilline-acide clavulanique.

Les taux de résistance aux céphalosporines de 1ère et de deuxième génération sont importants chez les souches d'*E.coli* et les souches de *Klebsiella sp.*, néanmoins aucune souche n'est résistante aux carbapénèmes (Tableau XXIX).



**Tableau XXIX: Taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries par espèces.**

	AM	AMC	CF	CXM	FOX	ATM	IMP
<i>E.coli</i> (n=307)	70,35	65,47	31,27	11,07	1,95	2,28	0
<i>Proteus sp.</i> (n=27)	51,85**	40,7	3,7	7,4	0	0	0
<i>Klebsiella sp.</i> (n=41)	100*	78,04	43,9	29,26	4,87	14,63	0
<i>C. coeseri</i> (n=4)	100*	100	100	100	25	25	0
<i>C. freundii</i> (n=5)	100*	100*	100*	100	100*	0	0
<i>M. morgani</i> (n=2)	100*	100*	100*	100*	0	0	0
<i>Serratia sp.</i> (n=11)	100*	100*	100*	100*	0	0	0
<i>Enterobacter sp.</i> (n=4)	100*	100*	100*	100*	100*	0	0
Total (401)	57,35	61,84	29,67	14,21	2,24	3,49	0

AM : amoxicilline ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CF: Céfalotine (céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération) ; FOX : céfoxitine ; CXM : céfuroxime (céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération); ATM : Aztréonam ; IMP: Imipénème.

\*: Résistance naturelle

\*\* : Il est à noter que pour *Proteus sp.* l'espèce *vulgaris* est naturellement résistante à l'amoxicilline cependant, l'espèce *mirabilis* est la plus isolée des infections urinaires.

#### 1.4. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

La détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines est faite selon le profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines et par la recherche de l'image de synergie sur gélose Mueller Hinton ou additionnée de la cloxacilline.

##### 1.4.1. DD-test

Le DD-test, effectué pour les souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) sur MH a révélé la présence d'une image de synergie chez 30/ 34 des souches d'entérobactéries ce qui indique la présence probable d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE), et que 4/34 sont négatives pour le test.

Les résultats du DD-test ainsi que les profils de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches résistantes aux C3G sont montrés par le tableau XXX.

Tableau XXX: Profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G.

Code	SOUCHE	AM	AMC	CF	CXM	CTX	CAZ	ATM	Synergie	CPO	FEP	FOX
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	R	R	R	R	R	R	ND	+	R	R	S
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	R	R	I	S	R	R	ND	+	R	R	S
HD31	<i>Citrobacter sp.</i>	R	R	R	R	R	R	ND	+	S	S	S
HD57	<i>Citrobacter sp.</i>	R	R	R	R	R	R	I	+	R	R	I
A06	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	+	S	S	S
A10	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	S	S	R
A100	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S
A36	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	ND	-	S	S	R
A37	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	S	R	ND	+	S	S	S
A43	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	ND	-	S	S	R
A53	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	I
A62	<i>E.coli</i>	R	I	R	R	R	R	R	+	R	R	I
A84	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S
A89	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	S	ND	+	S	S	S
A91	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	+	I	R	S
A99	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S
DD17	<i>E.coli</i>	R	R	S	R	R	S	ND	+	S	S	S
HD27	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	ND	+	R	R	S
HD38	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	+	R	I	S
HD40	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	I
HD49	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	+	R	I	S
HD54	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	S	ND	+	S	S	S
HD56	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	I	ND	+	R	I	S
A101	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	I	R	+	R	R	S
A102	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S
A35	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	ND	+	R	I	S
A40	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	I	ND	+	R	R	S
A55	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	ND	R	R	S	+	I	R	S
A60	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S

Code	SOUCHE	AM	AMC	CF	CXM	CTX	CAZ	ATM	Synergie	CPO	FEP	FOX
A61	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	R	R	S
A70	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	I
HD51	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	S	R	R	R	R	+	R	R	R
A98	<i>M. morganii</i>	R	R	R	R	R	R	S	+	S	S	S
A93	<i>Proteus sp.</i>	R	R	R	R	R	R	ND	+	S	S	S

Suite de tableau : **Profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G.**

ND : Non déterminé.

+ : Présence d'image de synergie.

- : Absence d'image de synergie.

R : Résistant, S : sensible, I : intermédiaire.

### 1.4.2. DD-test sur Mueller Hinton à la cloxacilline

Pour les souches A10, A36, A43 et A70 qui n'ont pas présenté une image de synergie sur gélose MH, le même test est effectué sur gélose MH additionnée de la cloxacilline à 250µg/ml puis 500µg/ml, s'il n'y a pas de récupération. Seules les souches qui présentent une récupération de 6mm dans les diamètres des zones d'inhibition qui sont considérées positives pour le test. Les diamètres des zones d'inhibition de ces souches sur gélose MH puis sur gélose additionnée de la cloxacilline sont donnés par le tableau XXXI.

**Tableau XXXI : Diamètres des antibiotiques sur gélose MH à la cloxacilline.**

SOUCHE		AMC	CTX	CAZ	PEP	CPO	FOX	SYN
A10	Ø sur MH	6	16	6	30	29	12	-
	R/S/I	R	R	R	S	S	R	
	Ø*	21	20	19	32	30	23	
	R/S/I	S	R	I	S	S	S	-
	≠ (mm)	15	4	13	2	1	11	/
A36	Ø sur MH	6	6	6	26	28	12	
	R/S/I	R	R	R	S	S	R	-
	Ø*	6	8	6	27	30	14	
	R/S/I	R	R	R	S	S	R	-
	Ø**	20	18	16	30	30	20	
	R/S/I	I	R	R	S	S	S	-
A43	Ø sur MH	6	15	10	30	28	12	
	R/S/I	R	R	R	S	S	R	-
	Ø*	14	18	14	30	29	15	
	R/S/I	5	R	R	S	S	R	-
	Ø**	21	20	17	30	30	23	
	R/S/I	S	R	R	S	S	S	-
	≠ (mm)	15	4	7	0	2	11	
A70	Ø sur MH	6	8	9	6	13	18	
	R/S/I	R	R	R	R	R	R	-
	Ø*	0	8	10	9	8	18	
	R/S/I	R	R	R	R	R	R	
	Ø**	6	12	12	10	18	22	-
	R/S/I	R	R	R	R	R	S	
≠ (mm)	0	4	3	4	5	4		

MH : Mueller Hinton.

Ø\* : Diamètre sur gélose Mueller Hinton additionnée de 250µg/ml de la cloxacilline;

Ø\*\* : Diamètre sur gélose Mueller Hinton additionnée de 500µg/ml de la cloxacilline.

R : Résistant, S : sensible, I : intermédiaire.

### 2.4.3. Prévalence des BLSE

Le nombre de souches d'entérobactéries productrices de BLSE est de 30 souches (7,48%). Le nombre de BLSE le plus prévalent est noté chez *E.coli* suivie par *Klebsiella sp.* avec 16 et 8 souches respectivement ; 4 BLSE sont déterminées chez *Citrobacter sp.* et 2 chez *Proteus sp.* et *M. morgani*(1,1). La prévalence des BLSE parmi les souches d'entérobactéries collectées au cours de notre étude témoigne l'émergence de ce phénomène dangereux en médecine de ville alors que jusqu'à la fin des années 90, les BLSE étaient principalement identifiées dans des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier (Carrère et Nordmann, 2009)

L'émergence des EBLSE dans les infections communautaires, particulièrement les infections urinaires est une réalité depuis une dizaine d'année. L'espèce la plus fréquemment observée est *E.coli* (Janvier et al., 2011).

Selon ce dernier, la flore digestive est le principal réservoir d'entérobactéries et parmi celles-ci, *E.coli* est l'espèce la plus prédominante. Dans les infections communautaires à EBLSE, un portage digestif associé est retrouvé dans environ 70% des cas.

Plusieurs études citées par Janvier et coll. (2011), ont estimé le portage digestif entre 0,1 à 13,1%.

La prévalence des souches d'entérobactéries productrices d'une BLSE par espèces est donnée par le tableau XXXII.

**Tableau XXXII: Prévalence des BLSE chez les entérobactéries résistantes aux C3G.**

Souches	Nombre de souches non BLSE	Nombre de souches BLSE	Total	%
<i>E.coli</i>	291	16	307	5.21
<i>Klebsiella sp.</i>	33	8	41	19.51
<i>Proteus sp.</i>	26	1	27	3.7
Autres	21	5	26	19.23
Total	371	30	401	7.48

Autres : *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, et *M.morgani*

Les tests statistiques d'indépendance ont montré une association entre l'espèce bactérienne et le nombre de BLSE ( $p < 0,05$ ). Le test exact de Fisher (Tableau XXXIII) montre que le nombre de BLSE est significativement supérieur chez *Klebsiella sp.* au seuil  $\alpha = 5\%$ .

**Tableau XXXIII : Significativité par case (Test exact de Fisher)**

	Nombre de souches non BLSE	Nombre de souches BLSE
<i>E.coli</i>	>	<
<i>Klebsiella sp.</i>	>	<
<i>Proteus sp.</i>	>	<
<i>Autres</i>	<	>

Les valeurs affichées en gras sont significatives au seuil  $\alpha=0,05$ .

Ces 20 dernières années, *Klebsiella pneumoniae* a démontré ses particularités d'acquisition de plasmides exprimant des BLSE. Différentes études de surveillance mondiale ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *Klebsiella pneumoniae*. En Europe, entre 1997 et 2004, la prévalence des *Klebsiella pneumoniae* BLSE est passée de 9 à 13 %. En Amérique de Sud, la prévalence des BLSE produite par le genre *Klebsiella* est la plus élevée du monde (45.4 à 51. 9%) (Carrër et Nordmann, 2009).

Sur le nombre total des souches productrices de BLSE, 18 souches sont également résistantes aux quinolones, ce qui suggère l'association des déterminants génétiques de la résistance aux quinolones avec ceux des BLSE et le plus souvent avec CTX-M-15.

Plusieurs études Algériennes ont décrit l'association entre le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et le gène *qnrB1* ou *S1*. Cependant, une étude menée par Meradi et coll. (2009) a démontré l'association de *qnrB1* avec une BLSE de type CTX-M-28. Cette détection est considérée la première en Algérie et la deuxième en Afrique après celle faite en Tunisie par Ben Achour et coll. (2009). Cette enzyme est phylogéniquement liée à CTX-M-15 et elle risque d'être responsable d'une épidémie à *Klebsiella*.

#### 2.4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices aux  $\beta$ -lactamines ont été déterminées pour certaines souches (HD12, HD57, HD06, A100, A10, A36, A37, A40, A43, A84, A99, HD40, HD27, A102, A35, A53, A55, A61, A62, A70 et HD51) par rapport à la céfoxitine (FOX), la ceftazidime(CAZ), le céfotaxime(CTX) le céfépime (FEP) et l'aztréonam(ATM) sur gélose Mueller Hinton et sur gélose MH additionnée de la cloxacilline à 500 $\mu$ g/ml pour les souches résistantes ou intermédiaires à la céfoxitine (FOX). Le tableau XXXIV et le tableau XXXV montrent les résultats et l'interprétation des CMI obtenus pour les souches testées selon le CA-SFM (2010).

Tableau XXXIV : Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices aux  $\beta$ -lactamines.

Code	SOUCHES	CMI CAZ		CMI CTX		CMI ATM	CMI FEP		CMI FOX		Phénotype probable
		MHS	CLOXA	MHS	CLOXA	MHS	MHS	CLOXA	MHS	CLOXA	
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	128	/	>128	/	16	64	/	/	/	BLSE
HD57	<i>Citrobacter sp.</i>	4	4	8	4	16	16	/	64	16	BLSE+Case+IMP
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	128	/	>128	/	16	/	/	/	/	BLSE
A100	<i>E.coli</i>	16	/	4	/	>128	/	/	/	/	BLSE
A10	<i>E.coli</i>	64	8	32	16	64	/	/	64	16	Case+IMP
A36	<i>E.coli</i>	>128	8	128	32	64	/	/	128	16	Case+IMP
A37	<i>E.coli</i>	128	/	/	/	/	/	/	/	/	Ceftazidimase
A40	<i>E.coli</i>	64	/	>128	/	/	64	/	/	/	BLSE
A43	<i>E.coli</i>	>128	4	128	32	128	/	/	64	2	Case
A84	<i>E.coli</i>	32	/	128	/	64	/	/	/	/	BLSE
A99	<i>E.coli</i>	16	/	128	/	64	64	/	/	/	BLSE
HD40	<i>E.coli</i>	32	/	>128	/	64	64	/	16	16	BLSE+IMP
HD27	<i>E.coli</i>	16	/	>128	/	64	8	/	/	/	BLSE
A62	<i>E.coli</i>	16	16	>128	64	64	64	16	32	8	BLSE+Case
A53	<i>E.coli</i>	32	32	128	128	128	128	64	32	16	Case+IMP
A102	<i>K.pneumoniae</i>	16	/	128	/	128	/	/	/	/	BLSE
A35	<i>K.pneumoniae</i>	16	/	>128	/	/	64	/	/	/	BLSE
A55	<i>K.pneumoniae</i>	16	/	>128	/	128	32	/	/	/	BLSE
A61	<i>K.pneumoniae</i>	>128	/	>128	/	>128	/	/	/	/	BLSE
A70	<i>K.pneumoniae</i>	16	16	128	128	32	64	64	16	16	IMP+ Oxa
HD51	<i>K.pneumoniae</i>	64	4	128	64	128	64	16	16	2	BLSE+Case

IMP : imperméabilité, Case : céphalosporinase, Oxa: oxacillinase.

Tableau XXXV : interprétation des concentrations minimales inhibitrices en S/I/R

Code	SOUCHES	R/S/I CAZ		R/S/I CTX		R/S/I ATM	R/S/I FEP		R/S/I FOX		Phénotype probable
		MHS	CLOXA	MHS	CLOXA	MHS	MHS	CLOXA	MHS	CLOXA	
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	R	/	R	/	R	R	/	/	/	BLSE
HD57	<i>Citrobacter sp.</i>	I	I	R	R	R	R	/	R	I	BLSE+Case+IMP
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	R	/	R	/	R	/	/	/	/	BLSE
A100	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	R	/	/	/	/	BLSE
A10	<i>E.coli</i>	R	I	R	R	R	/	/	R	I	Case+IMP
A36	<i>E.coli</i>	R	I	R	R	R	/	/	R	I	Case+IMP
A37	<i>E.coli</i>	R	/	/	/	/	/	/	/	/	Ceftazidimase
A40	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	/	R	/	/	/	BLSE
A43	<i>E.coli</i>	R	I	R	R	R	/	/	R	S	Case
A84	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	R	/	/	/	/	BLSE
A99	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	R	R	/	/	/	BLSE
HD40	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	R	R	/	I	I	BLSE+IMP
HD27	<i>E.coli</i>	R	/	R	/	R	I	/	/	/	BLSE
A62	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	S	BLSE+Case
A53	<i>E.coli</i>	32	32	128	128	128	128	64	32	16	Case+IMP
A102	<i>K.pneumoniae</i>	R	/	R	/	R	/	/	/	/	BLSE
A35	<i>K.pneumoniae</i>	R	/	R	/	/	R	/	/	/	BLSE
A55	<i>K.pneumoniae</i>	R	/	R	/	R	R	/	/	/	BLSE
A61	<i>K.pneumoniae</i>	R	/	R	/	R	/	/	/	/	BLSE
A70	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	I	I	IMP+Oxa
HD51	<i>K.pneumoniae</i>	R	I	R	R	R	R	R	I	S	BLSE+Case

IMP : imperméabilité, Oxa: oxacillinase, R : Résistant, S : sensible, I : intermédiaire.



Les résultats des CMI montrent que les souches d'entérobactéries, résistantes aux C3G, exhibent des concentrations minimales inhibitrices très élevées aux  $\beta$ -lactamines ce qui suggère la présence simultanée de plusieurs mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

Les CMI pour la cetazidime (CAZ) vont de 4 à  $>128\mu\text{g/ml}$  sur gélose MH et de 4 à  $32\mu\text{g/ml}$ , donc toutes les souches testées sont résistantes à la CAZ que ce soit sur milieu MH ou MH additionnée de la cloxacilline. Les CMI sur gélose à la cloxacilline ont diminué de 8 à 32 fois pour les souches A10, HD51, A36 et A43, respectivement. Donc, ces souches sont probablement productrices d'une céphalosporinase. Les souches A62, A70, HD57 et A53 n'ont pas présenté une récupération dans les CMI sur gélose à la cloxacilline par rapport à celles sur MH.

Pour le CTX, elles vont de 4 à  $128\mu\text{g/ml}$  que ce soit sur MH ou additionnée de la cloxacilline. Les souches ayant présenté une récupération dans les CMI sur gélose à la cloxacilline sont HD57, A10, A36, A43, A62 et HD51. Cette récupération est faible par rapport à la récupération de la CAZ (2 à 4 fois).

Les CMI de céfépime vont de 8 à  $128\mu\text{g/ml}$  pour toutes les souches testées. Les souches A53, A62, et HD51 ont présenté des récupérations de 2 à 3 fois dans leurs CMI à cet antibiotique sur gélose à la cloxacilline. Cependant, les céphalosporinases n'hydrolysent pas efficacement les C4G que dans le cas de mutations ponctuelles ou de délétion de plusieurs bases au niveau de la région codante de l'AmpC, dite hélice alpha 10. Ces deux types de modification augmentent l'affinité de ces enzymes au céfépime (Philippon et Arlet, 2006).

Les CMI des souches testées à l'aztréonam (HD12, HD57, HD06, A100, A10, A36, A43, A84, A99, HD40, HD27, A102, A53, A55, A61, A62, A70, et HD51) sont très élevées ( $16$  à  $>128\mu\text{g/ml}$ ) car les BLSE hydrolysent efficacement l'aztréonam et l'hyperproduction d'une céphalosporinase est probablement présente chez certaines de ces souches qui peut hydrolyser l'aztréonam en cas d'hyperproduction. Évidemment, les souches HD57, A10, A36, A43, A53, A62 et HD51 ont présenté des récupérations dans leurs CMI à la céfoxetine ce qui suggère que ces souches sont productrices d'une céphalosporinase.

La souche A70 qui ne présente pas de récupération dans les CMI sur gélose à la cloxacilline est probablement productrice d'une céphalosporinase hyper produite non inhibée par  $500\mu\text{g/ml}$  de la cloxacilline. Cependant le système d'efflux et l'imperméabilité membranaire, les plus probables pour cette souche, ne peuvent pas être exclus dans l'attribution à ces CMI élevées pour les souches testées.

#### 2.4.5. Prévalence des céphalosporinases

Le nombre de céphalosporinases déterminé chez nos souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est réduit, il n'y a que 7 souches qui sont productrices d'une céphalosporinase : HD57, A10, A36, A43, A53, A62 et HD51 sur 34 résistantes aux C3G.

Les souches A10, A36, et A43 ont présenté une récupération dans les diamètres des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton à la cloxacilline. La récupération dans les diamètres des zones d'inhibition est expliquée par le fait que le mécanisme de résistance, de ces bactéries à ces antibiotiques, est la production d'une céphalosporinase. Etant donné que cette enzyme est inhibée par la cloxacilline, les bactéries perdent l'activité de leur enzyme et par conséquent leur résistance.

#### 2.4.6. Prévalence de l'imperméabilité membranaire

Le phénotype imperméabilité membranaire est probablement présent chez 6/21 souches pour les quelles les CMI sont déterminées. Cependant, ce phénotype ne peut être confirmé qu'en effectuant le test en présence d'inhibiteurs du système d'efflux comme le PA $\beta$ N (phénylalanine Arginine- $\beta$ -Naphthylamide).

### 1.5. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

La détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines est effectuée en se basant sur le profil de résistance des souches aux antibiotiques, la présence de l'image de synergie entre l'acide clavulanique et C3G, C4G ou l'aztréonam, la récupération dans les diamètres des zones d'inhibition sur gélose à la cloxacilline et les résultats des CMI.

#### 2.5.1. Phénotype de résistance chez d'*E.coli*

*E.coli* est une souche naturellement sensible à tous les antibiotiques, elle se caractérise par son aptitude à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques habituellement actifs, pouvant parfois survenir en cours d'antibiothérapie (Lavigne et al., 2002).

Au cours de notre étude 307 souches d'*E.coli* ont été collectées. 70.35% des souches étaient résistantes à l'amoxicilline, 65.47 % à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 31.27 %, 11.07 % et 6.18 % aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération respectivement.

La comparaison des résultats obtenus par notre étude avec ceux des autres études, menées que ce soit en communautaire ou à l'hôpital, montre que nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Ahoyo et *al.* (2007), Tagajdid et *al.* (2010), Dromigny et *al.* (2005) et Talon et *al.* (2004) et significativement supérieurs aux résultats obtenus par Prère et *al.* (2004), Dromigny et *al.* (2005) et Talon et *al.* (2004).

Les valeurs affichées en gras dans le tableau XXXVI sont significativement différentes à nos résultats au seuil de signification 5%.

**Tableau XXXVI : Comparaison des taux de résistance des souches d'*E.coli* obtenus par notre étude avec les autres études.**

Pays	Année d'étude	AM	AMC	CF	CXM	C3G	P valeur	Référence
<i>Nos résultats</i> (n=307)	2010-2011 (c)	70,35	65,47	31,27	11,07	6,18		
France	2002-2003 (C)	<b>53</b>	<b>47</b>	/	/	/	<0,05	Prère et <i>al.</i> , 2004
Bénin	2005 (h)	69,84	62,43	30,15	/	/	>0,05	Ahoyo et <i>al.</i> , 2007
Maroc	2005-2007 (C)	/	50	/	/	/	>0,05	Tagajdid et <i>al.</i> , 2010
Maroc	2005-2007 (h)	/	60	/	/	/	>0,05	Tagajdid et <i>al.</i> , 2010
Sénégal	2001-2003 (C)	/	<b>57,5</b>	<b>48,2</b>	/	6,5	<0,05	Dromigny et <i>al.</i> , 2005
France	1999 (h)	<b>39,6</b>	<b>36,1</b>	36,1	/	<b>1</b>	<0,05	Talon et <i>al.</i> , 2004
France	2001(h)	<b>46,9</b>	<b>40,9</b>	40,9	/	<b>0,9</b>	<0,05	
Tunisie	2008 (h)	<b>59,8</b>	<b>33,2</b>	/	/	<b>1,7</b>	<0,05	Ferjani et <i>al.</i> , 2010
France	2007 (C)	<b>45,06</b>	<b>24,57</b>	/	/	<b>1,18</b>	<0,05	Thibaut et <i>al.</i> , 2010

C : communautaire, h : hospitalier.

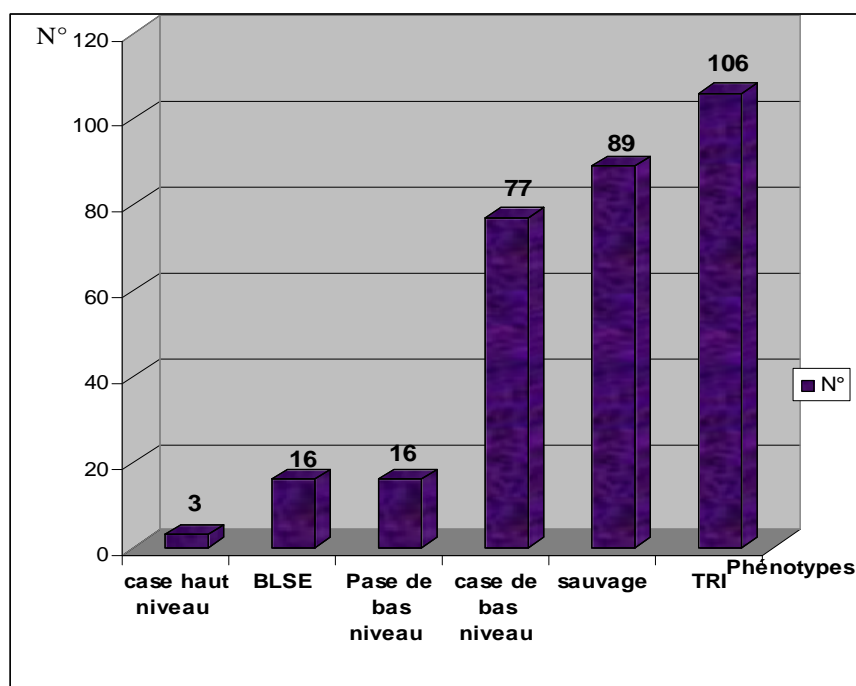
La détermination phénotypique des mécanismes de résistance enzymatique des souches d'*E.coli* aux  $\beta$ -lactamines est faite selon le tableau XXXVII:

**Tableau XXXVII: Phénotypes de résistance d'*E.coli* aux  $\beta$ -lactamines (Lavigne et *al.*, 2002)**

Phénotype	AM	AMC	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM
Sauvage	S	S	S	S	S	S	S	S
Pase bas niveau	R	S	S/I	S	S	S	S	S
Pase haut niveau	R	I/R	I/R	I/R	S	S	S	S
BLSE	R	R	R	S	R	R	R	S
TRI	R	R	S	S	S	S	S	S
Case bas niveau	R	R	R	S	S	S	S	S
Case haut niveau	R	R	R	R	R	R	S	S
Case + Pase	R	R	R	S	R	S	S	S

AM : amoxicilline ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CF : céfalotine ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; IPM : imipénème ; Case : céphalosporinase ; Pase : pénicillinase ; BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu ; TRI : TEM résistant aux inhibiteurs.

Les différents phénotypes de la résistance, des souches d'*E.coli* collectées, sont présentés par la figure 23.



**Figure 23 : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'*E.coli***

Au cours de notre étude,  $\approx 30\%$  (89/307) des souches d'*E.coli* qui sont du phénotype sauvage aux  $\beta$ -lactamines. Le phénotype de résistance le plus prévalent est le phénotype TRI (TEM résistant aux inhibiteurs). Ce sont des  $\beta$ -lactamases qui dérivent des pénicillinases plasmidiques entraînant une résistance aux inhibiteurs suicides. Elles confèrent une résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, seules ou en association avec l'acide clavulanique et un bas niveau de résistance aux C1G (Lavigne et *al.*, 2002).

Le phénotype Case (céphalosporinase) de bas niveau, viens en deuxième rang, avec un taux de 25.08% (77/307). Ce phénotype est, dans la plupart des cas, réprimé chez *E.coli*. Il confère une résistance aux aminopénicillines, aux C1G et pour certaines souches aux C2G. Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline mais sont insensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Robberts et *al.*, 2009). Cependant, 3 souches (A10, A36 et A 43) d'*E.coli* sont du phénotype hyperproduction d'une céphalosporinase.

*E.coli* possède dans son chromosome le gène codant pour la  $\beta$ -lactamase de type AmpC. Souvent, des quantités faibles de cette enzyme qui sont produites car le gène *ampC* est

régulé par un faible promoteur et un atténuateur fort. La souche d'*E.coli* est donc sensible aux céphamycines. Néanmoins, des études sur les mécanismes de résistance aux céphamycines ont identifié des mutations au niveau du promoteur ou d'atténuateur qui conduisent à l'hyperproduction d'AmpC. Dans certains cas, les souches résistantes aux céphamycines produisent des  $\beta$ -lactamases plasmidiques tel CMY-2 qui dérive des AmpC chromosomique de certaines bactéries (Pitou et *al.*, 2007).

L'hyperproduction du gène *ampC* peut être expliquée par l'absence des gènes de régulation de type *ampR* ou autres chez les céphalosporinases plasmidiques ou par des mutations dans le promoteur, des mutations dans le système d'atténuation, l'insertion d'une séquence IS2 ou l'amplification génétique de la céphalosporinase chromosomique (Philippon et *al.*, 2002). Cependant, phénotypiquement on ne peut pas distinguer entre l'hyperproduction chromosomique et plasmidique.

Le phénotype hyperproduction d'une AmpC est probablement associé à l'altération de la perméabilité membranaire chez les souches A10 et A36 et seul chez la souche A43 car cette dernière devient sensible à la FOX sur gélose à la cloxacilline.

La production d'une pénicillinase de bas niveau et de  $\beta$ -lactamases à spectre élargie (BLSE) sont des phénotypes moins prévalents chez les souches collectées de cette espèce (5,21%).

Les pénicillinases de bas niveau sont en majorité codées par un plasmide. Les plus fréquentes sont les TEM-1. L'enzyme SHV-1 est une pénicillinase d'origine chromosomique. Le spectre d'activité comprend les pénicillines, les C1G et même les C2G. L'association d'une  $\beta$ -lactamine avec un inhibiteur suicide de  $\beta$ -lactamase permet la restauration initiale de la  $\beta$ -lactamine (Lavigne et *al.*, 2002).

Les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases plasmidiques capables d'hydrolyser non seulement les pénicillines mais également les céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> (à l'exception des céphamicines), 3<sup>ème</sup> et de 4<sup>ème</sup> génération ainsi que les monobactames d'où leur nom à large spectre. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique, sulbactame, ou le tazobactame (Muratani et Mastimoto, 2006 ; Robberts et *al.*, 2009).

La première  $\beta$ -lactamase plasmidique hydrolysant les C3G est isolée pour la première fois en 1983 en Allemagne. Elle s'agit d'une dérivée de la  $\beta$ -lactamase à spectre étroit SHV-1 par une seule mutation responsable de l'élargissement du spectre d'hydrolyse. Cette enzyme est ensuite nommée SHV-2. Une autre enzyme nommée TEM-3 a été également identifiée, un an plus tard, en France. (Kliebe et *al.*, 1985 cité par Ruppé, 2010).

Une autre BLSE, non TEM et non SHV a été caractérisée en Allemagne par Bauerfeid et coll. en 1989. Cette enzyme nommée CTX-M pour céfotaximase en raison de son activité préférentielle pour le céfotaxime par rapport à la céftazidime (Ruppé, 2010).

Plusieurs types de BLSE autres que les mutants de TEM et de SHV ont été décrits chez les entérobactéries incluant les enzymes CTX-M, VEB, GES, PER, TLA, BES et SFO. Cependant, les CTX-M sont les plus propagées (Rossolini et al., 2008).

En effet, les souches d'entérobactéries productrices de CTX-M sont résistantes aux CTX (CMI > 64 µg/ml) et plus ou moins sensibles à la CAZ (CMI de 2 à 8 µg/ml), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables (Cattoire, 2008).

Le type de BLSE produite par les souches d'*E.coli* résistantes aux C3G est déterminé selon le spectre d'hydrolyse des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et de 4<sup>ème</sup> génération. Le tableau XXXVIII montre les critères de la détermination des types de BLSE.

**Tableau XXXVIII: Critères de détermination des types de BLSE.**

Phénotype	CTX	CAZ	C4G	Synergie
CTX-M-15, -16, -27 ou -55	R	R	R	+/-
BLSE autres que les CTX-M	R	R	S	+
BLSE de type ceftazidimase	S	R	S	+
CTX-M autre que CTX-M-15,-16,-27ou-55	R	S	S	+

Les différents types de BLSE obtenus au cours de notre étude chez les souches d'*E.coli* résistantes aux C3G sont montrés par le tableau XXXIX :

Tableau XXXIX: Types de BLSE

CD UNI	SOUCHÉ	CTX	CAZ	ATM	Synergie	CPO	FEP	Phénotype	Type de BLSE
A84	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A99	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A06	<i>E.coli</i>	R	S	S	+	S	S	BLSE	CTX-M autre que CTX-M-15,- 16,-27ou-55
A37	<i>E.coli</i>	S	R	ND	+	S	S	BLSE	BLSE de type ceftazidimase
A53	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE+Case	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A62	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE+Case	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A89	<i>E.coli</i>	R	S	ND	+	S	S	BLSE	CTX-M autre que CTX-M-15,- 16,-27ou-55
A91	<i>E.coli</i>	R	R	S	+	I	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A100	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
HD27	<i>E.coli</i>	R	R	ND	+	R	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
HD38	<i>E.coli</i>	R	R	S	+	R	I	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
HD40	<i>E.coli</i>	R	R	R	+	R	R	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
HD49	<i>E.coli</i>	R	R	S	+	R	I	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
HD54	<i>E.coli</i>	R	S	ND	+	S	S	BLSE	CTX-M autre que CTX-M-15,- 16,-27ou-55
HD56	<i>E.coli</i>	R	I	ND	+	R	I	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
DD17	<i>E.coli</i>	R	S	ND	+	S	S	BLSE	CTX-M autre que CTX-M-15,- 16,-27ou-55

La détermination de type de BLSE produite par nos souches d'*E.coli* résistantes aux C3G a révélé le type CTX-M-15, -16, -27 ou -55 est la BLSE la plus dominante. 11/16 des souches d'*E.coli* sont de ce phénotype. Ces souches sont A84, A99, A53, A62, A91, A100, HD27, HD38, HD40, HD49, HD56 et DD17.

D'autres CTX-M autre que CTX-M-15,-16,-27ou-55 sont probablement présentes chez les souches A06, A89, HD54 et DD17.

Les CMI de nos souches d'*E.coli*, probablement productrices de CTX-M, sont toutes >64µg/ml pour le CTX, de 4 à 32 µg/ml pour la CAZ et >64µg/ml pour l'ATM excepté pour la souche A100. Cette souche exhibe une CMI de 4µg/ml pour le CTX, 16 µg/ml pour la CAZ et >128µg/ml pour l'ATM donc cette souche ne produit probablement pas une BLSE de type CTX-M.

Les CMI élevées au céfotaxime sont dues au fait que le substrat préférentiel des enzymes de type CTX-M est le céfotaxime par rapport à la céftazidime. La grande activité céfotaximase est liée à la géométrie de site de fixation des β-lactamines. Cette géométrie permet la fixation des pénicillines, des céphalosporines à spectre étroit et le céfotaxime mais pas la molécule de céftazidime (Rossolini et al., 2008). Cependant, le CA-SFM recommande de rendre systématiquement la céftazidime comme inactive en cas de présence de toutes BLSE (Ruppé, 2010).

Certains variant de CTX-M ont une activité augmentée sur la céftazidime : les CTX-M-32, -15, -16, et -27 dérivent respectivement de CTX-M-1, -3, -9, et -14 suite à une mutation ponctuelle en position 240(Asp-Gly). Cette mutation augmente d'environ 8fois les CMI à la CAZ par rapport aux CTX-M mère (Cattoire, 2008, Ruppé, 2010).

Enfin, la BLSE de type ceftazidimase est le phénotype le plus probable pour la souche A37 notamment qu'elle présente une CMI de 128µg/ml à la ceftazidime (CAZ) et sensible au céfotaxime.

Ce type d'enzyme, appartenant à la classe A, inclue BES, GES, VEB, SFO, TLA et PER. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que les BLSE de type TEM et SHV. Les enzymes de type VEB hydrolysant la CAZ et l'ATM ont été retrouvées chez les entérobactéries (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006). Cependant, on ne peut pas trancher si elle s'agit d'une BLSE de type TEM /SHV ou BLSE de type VEB et autres.



### 2.5.2. Phénotype de résistance chez *Klebsiella sp.*

*K. pneumoniae* et *K. oxytoca*, produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A sensibles aux inhibiteurs : SHV-1 (groupe fonctionnel 2b) ou LEN-1 (groupe 2a) pour *K. pneumoniae* et les enzymes de type OXY (groupe 2b) pour *K. oxytoca*. Ces enzymes confèrent une résistance apparente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux ureidopénicillines.

*K. oxytoca* peut hyperproduire sa  $\beta$ -lactamase due à des mutations dans le promoteur. Cette hyperproduction permet d'avoir une résistance à haut niveau à l'ensemble des pénicillines, aux C1G, C2G, à l'exception des céphamycines et à bas niveau à l'aztréronam. (Bonnet, 2006)

Au cours de cette étude, 41 souches de *Klebsiella sp.* ont été collectées. Les taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez ces souches sont élevés. Il est de 78% pour l'association amoxicilline- acide clavulanique, 43.9 % aux C1G, 29.26 % au céfuroxime, 21.95% aux C3G et aux C4G, 14.63% à l'ATM, 4.87 à la céfoxitine et aucune résistance n'est observée à l'IMP. Les différents taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines sont illustrés par la figure 24

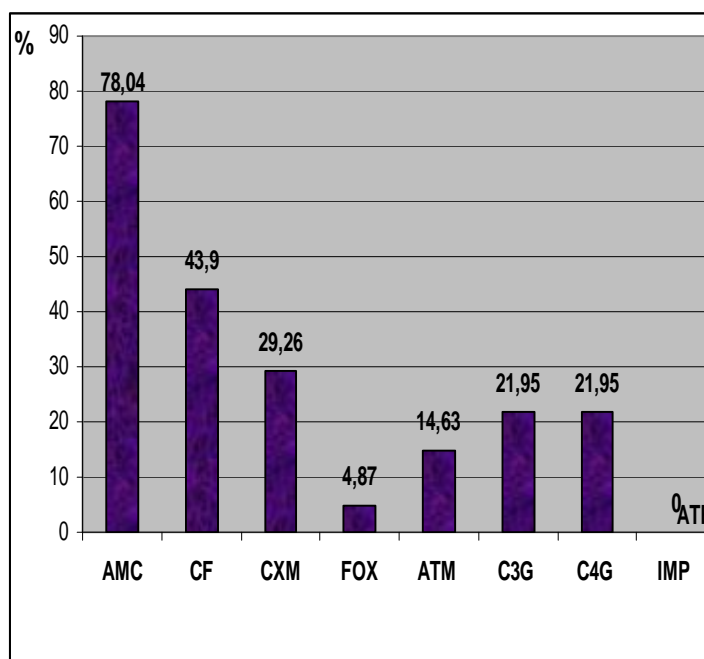


Figure 24 : Taux de résistance des souches de *Klebsiella sp.* aux  $\beta$ -lactamines

Nos résultats sont similaires à certains résultats, rapportés du Maghreb, tels que les taux de résistance au céfalotine et au C3G sont similaires à ceux rapporté par Ben Abdallah et coll. (2008) dans une étude hospitalière. La résistance aux C3G est également similaire à celle rapportée par Ben Haj Khalifa et Khedher (2010).

Cependant, le taux de résistance à l'AMC chez nos souches de *Klebsiella spp.* est beaucoup plus important par rapport à ceux rapportés des deux pays, que ce soit en médecine communautaire ou hospitalière.

Le taux de résistance aux C3G de notre étude est significativement supérieur à celui rapporté au Maroc par Nadmi et coll. (2010) et significativement inférieur à celui rapporté en Tunisie par Mkaouar et coll. (2008). Le tableau ci-dessous montre les valeurs écrites en gras sont significatives au seuil 5%.

**Tableau XL : Comparaison des taux de résistance des souches de *Klebsiella sp.* obtenus par notre étude avec les autres études.**

Pays	Année d'étude	AMC	CF	CXM	C3G	P	Référence
Nos résultats (n=41)	2010-2011 (c)	78,04	43,9	29,26	21,95		
Maroc	2008 (C)	<b>30,7</b>	/	/	<b>0</b>	<0.05	Nadmi et al., 2010
Tunisie	2002-2005 (h)	<b>42</b>	34,5	/	20	<0.05	Ben Abdallah et al., 2008
Tunisie	2009 (h)	<b>23,7</b>	/	/	22,7	<0.05	Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010
Tunisie	1999-2005 (h et C)	/	/	/	<b>36,65</b>	<0.05	Mkaouar et al., 2008
		/	/	/			

C : communautaire, h : hospitalier.

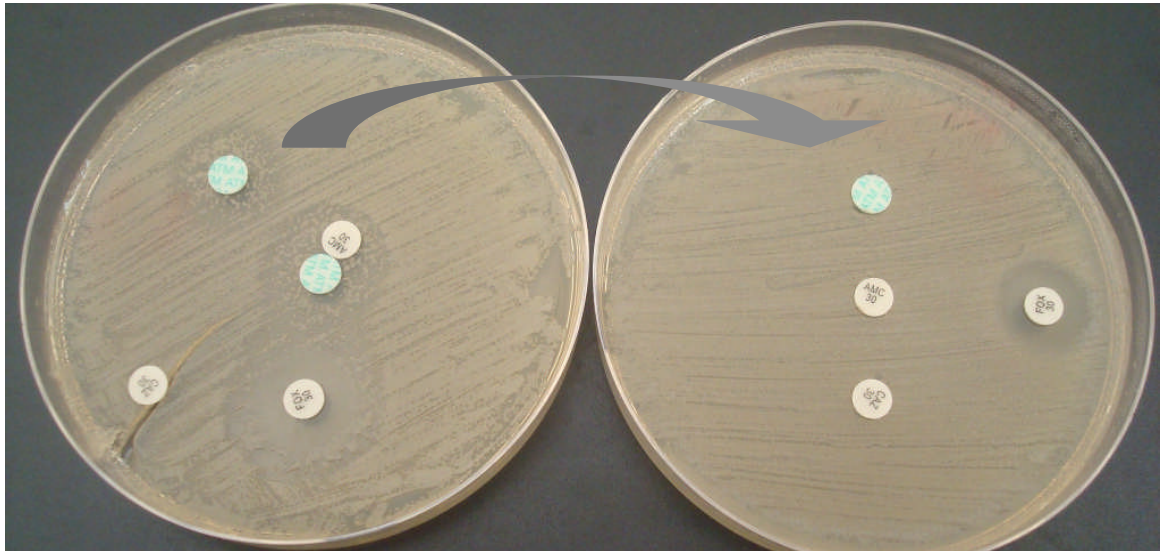
Les mécanismes de résistance les plus importants, aux céphalosporines à spectre élargi (CTX, CAZ) sont l'hyperproduction d'une pénicillinase chromosomique et la production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

Au cours de notre étude, 9 souches de *Klebsiella sp.* sont résistantes aux C3G, 8/9 sont productrices d'une BLSE. Les tests statistiques ont montré que le taux de résistance ainsi que le taux de souches productrices de BLSE, sont significatifs chez cette espèce au seuil  $\alpha=5\%$ .

La détermination de type de BLSE montre que la BLSE de type CTX-M-15, -16, -27 ou -55 est la BLSE la plus probable pour les souches ayant présenté une image de synergie sur Mueller Hinton.

En plus de BLSE de type CTX-M-15, -16, -27 ou -55, la souche HD51 est probablement productrice d'une céphalosporinase plasmidique. Elle a présenté une CMI,

sur gélose à la cloxacilline, 8fois moins que celle sur MH sans cloxacilline. Il est à noter que cette souche, a présenté une hétéro résistance aux molécules testées. Des colonies ont poussé à l'intérieur de la zone d'inhibition et l'antibiogramme effectué pour les mutants a révélé des niveaux de résistance élevés aux  $\beta$ -lactamines. La figure 25 illustre les antibiogrammes effectués pour la souche HD51 ainsi que pour le mutant.



**Figure 25: Antibiogramme de la souche HD51 ainsi que le mutant.**

Ce n'est que vers 1988, que sont apparues aux Etats Unis et en Europe, les premières souches cliniques de *Klebsiella sp.* montrant un phénotype de résistance de type céphalosporinase alors qu'elles n'en produisaient pas naturellement. Le phénotype observé est similaire à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite avec, généralement, une résistance aux C3G, une sensibilité aux mécillamine, aux C4G et à l'imipénème et enfin une résistance aux associations à l'acide clavulanique. La majorité des souches productrices est résistante au céfoxitine à l'exception de celles productrices de l'enzyme ACC-1. Contrairement aux céphalosporinas chromosomiques, les cases plasmidiques, sont le plus souvent, non inductibles à l'exception d'ACT-1, de DHA-1 et de CFE-1 qui présentent des gènes de régulation *ampR* en amont du gène de structure *ampC* (Philippon et Arlet, 2006).

Pour la souche A70, elle n'a pas présenté ni d'image de synergie, ni de récupération dans les diamètres des zones d'inhibition sur gélose à la cloxacilline. Donc, elle a probablement perdu une porine non spécifique.

La perte de porine non spécifique a été toujours liée à une résistance élevée aux antibiotiques hydrophiles tels que les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones (Martínez-

Martínez, 2008). La souche A70, *Klebsiella pneumoniae*, présente une CMI de 4µg/ml à la ciprofloxacine et de 32µg/ml à la gentamicine.

Néanmoins, un autre phénotype est probable pour cette souche à cause de sa résistance à la cloxacilline, c'est la production d'une oxacilinase. Cette enzyme, appartenant au nouveau sous groupe 2de de la nouvelle classification des β-lactamase de Bush et Jacoby (2010), hydrolyse, en plus de la cloxacilline ou l'oxacilline, les céphalosporines à spectre élargie incluant les oxyimino-β-lactames mais pas les carbapénèmes. La majorité des enzymes de sous groupe 2de dérive des OXA-10 par une à 9 substitutions d'acides aminés et inclue les enzymes OXA-11 et OXA-15. Ces enzymes expriment, le plus souvent, une résistance plus prononcée au ceftazidime par rapport au céfotaxime et l'aztréonam. Cependant, certains organismes producteurs des oxacillinases de type OXA-1 ou OXA-31 peuvent être sensibles à la céftazidime mais pas au céfépime (Bush et Jacoby, 2010).

Pour la souche A70, elle a présenté des CMI importantes à la CTX et FEP, qui sont de 128 et 64µg/ml respectivement par rapport aux CMI à la CAZ, FOX et ATM, 16, 16, 32 µg/ml respectivement.

Cette souche, si elle est productrice d'une oxacilinase, elle peut être une OXA-1 ou OXA-31 combinée à une imperméabilité membranaire car les oxacillinases n'hydrolysent pas la céfoxitine.

Tableau XLI : Types de BLSE produites pas les souches de *Klebsiella sp.* ainsi que les phénotypes probables.

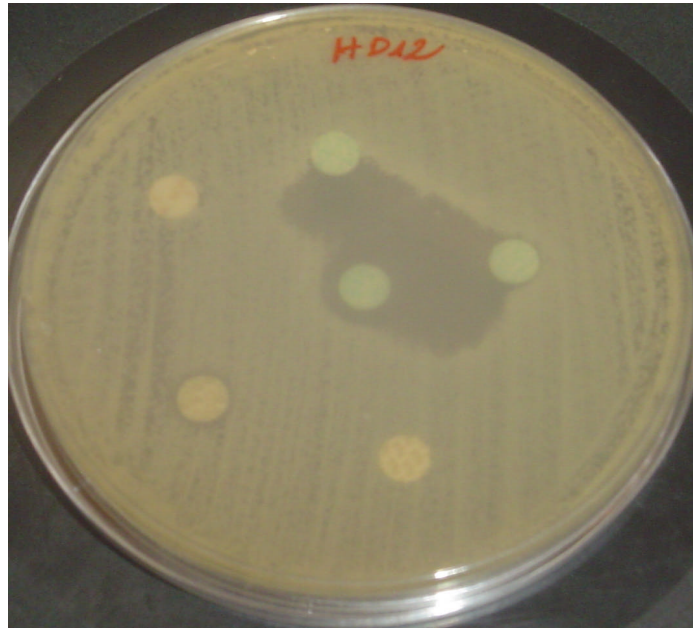
Code	SOUCHE	CTX	CAZ	ATM	CPO	FEP	FOX	Phénotype	Type de BLSE
A101	<i>Klebsiella sp.</i>	R	I	R	R	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A102	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A35	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	ND	R	I	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A40	<i>Klebsiella sp.</i>	R	I	ND	R	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A55	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	S	I	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A60	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A61	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	S	BLSE	CTX-M-15, -16, -27 ou -55
A70	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	I	IMP	Oxacillinase
HD51	<i>Klebsiella sp.</i>	R	R	R	R	R	R	BLSE+Case	CTX-M-15, -16, -27 ou -55

### 2.5.3. Phénotype de résistance chez *Citrobacter sp.*

Au cours de cette étude, 9 souches de *Citrobacter sp.* ont été collectées dont 5 sont de l'espèce *freundii* et 4 *Koseri*. Toutes les souches de *Citrobacter sp.* résistantes aux C3G sont de l'espèce *Koseri*. Elles sont toutes résistantes à l'AMC, CF, et CXM. Une seule souche est résistante à la FOX (HD57).

Cette espèce produit naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A, CKO, sensibles aux inhibiteurs et conférant une résistance apparente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux ureidopénicillines (Bonnet, 2006).

Ces souches sont HD31, HD06, HD12 et HD57. Elles sont toutes productrices d'une BLSE de type CTX-M-15, -16, -27 ou -55. La figure 26 montre l'image de synergie obtenue avec la souche HD12.



**Figure 26 : Antibiogramme de la souche HD12.**

La souche HD57 est également résistante au céfoxitine ce qui suggère la production d'une céphalosorinase. Les résultats des CMI obtenus pour les souches HD06, HD12 et HD57 confirment les phénotypes suggérés.

#### 2.5.4. Phénotype de résistance chez *Proteus sp.*

Sur 27 souches de *Proteus sp.* une seule souche (A93) est résistante aux C3G. Les taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches de *Proteus sp.* sont illustrés par la figure 27.

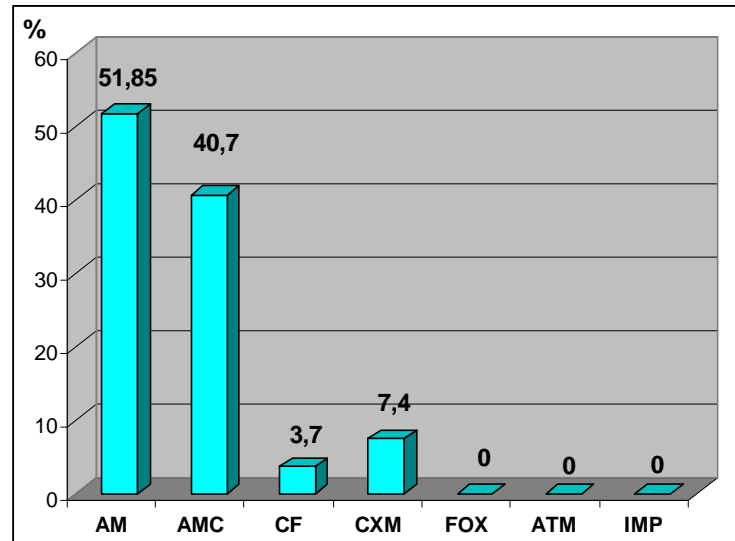


Figure 27: Taux de résistance des souches de *Proteus sp.* aux  $\beta$ -lactamines.

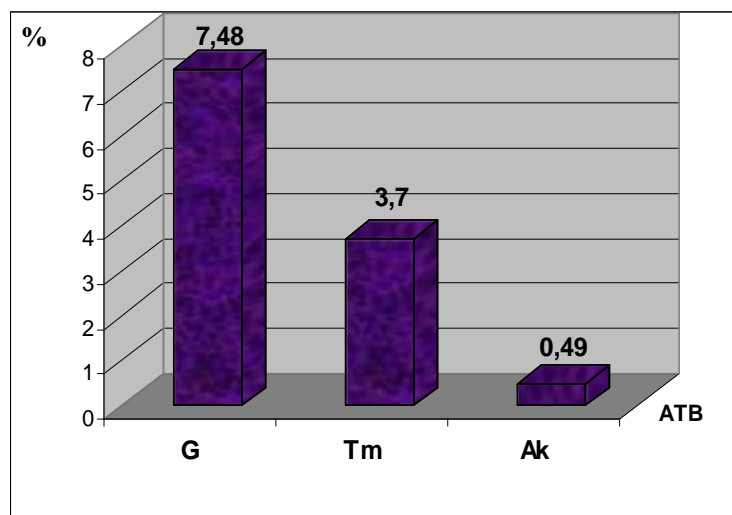
La souche A93 est résistante aux C3G mais pas aux C4G et elle a présenté une image de synergie sur gélose Mueller Hinton ce qui suggère la production d'une BLSE autre que les CTX-M.

#### 2.5.5. Phénotype de résistance chez *M. morgani*

Seules deux souches de l'espèce *M. morgani* ont été collectées durant de notre étude et une seule souche est résistante aux C3G, c'est la souche A98. Cette souche est probablement productrice d'une BLSE autre que les CTX-M car elle n'est pas résistante aux C4G.

### II.3. Résistance aux aminosides

Sur 401 souches d'entérobactéries, 30 souches ont été résistantes à la gentamicine, soit un taux de 7,48% dont 15 souches sont résistantes à la tobramycine (3,7%) et deux résistantes à l'Amikacine (0,49 %). Ces taux de résistance sont montrés par la figure 28.



**Figure 28 : Taux de résistance aux aminosides chez les entérobactéries**

Ces souches sont toutes d'origine urinaire à l'exception de deux souches : A61 et A88 qui sont du prélèvement de pus.

Nous notons que la majorité des souches résistantes à la gentamicine appartient aux espèces *E.coli* et *Klebsiella sp.* avec 18 et 9 souches soit des taux de 6.18 % et 21. 95% respectivement. 2 souches sont de l'espèce *Citrobacter sp.* et 1 *Proteus sp.*

Le taux de résistance aux aminosides noté chez les souches d'*E.coli*, durant notre étude, est similaire à ceux rapportés par Nadmi et al. (2010), Husičková et al. (2011), Ferjani et al. (2011) et Ben Abdallah et al. (2008), et significativement supérieur à celui rapporté par Sekhsokh et al. (2008).

Le taux de résistance chez *Klebsiella sp.* est similaire à ceux rapportés par Husičková et al. (2011) et Ben Abdallah et al. (2008) et significativement supérieur aux taux rapportés par Nadmi et al. (2010) et Ferjani et al. (2011).

Le tableau ci-dessous résume la comparaison des taux de résistance observés chez nos souches de *Klebsiella sp.* et *E.coli* avec ceux des autres études. Les valeurs en gras sont significatives au seuil  $\alpha=5\%$ .



**Tableau XLII : Comparaison des taux de résistance, aux aminosides, des souches d'*E.coli* de *Klebsiella sp.* obtenus par notre étude avec les autres études.**

Pays	Année d'étude	GR	<i>E.coli</i> N=307	<i>Klebsiella sp.</i> n=41.	P	Référence
<i>Nos résultats</i>	2010-2011 (c)	7,48	6.18	21.95		
Maroc	2008 (c)	/	8.7	<b>0</b>	<0.05	Nadmi et <i>al.</i> , 2010
Maroc	2005 (h et c)	/	<b>0.74</b>	/	<0.05	Sekhsokh et <i>al.</i> , 2008
République Tchèque	2009-2010 (h)	/	9.3	5.2	/	Husičková et <i>al.</i> , 2011
Tunisie	2009 (h)	/	7.3	<b>0</b>	<0.05	Ferjani et <i>al.</i> , 2011
Tunisie	2002-2005 (h)	/	5.3	19.5	>0.05	Ben Abdallah et <i>al.</i> , 2008

C : communautaire, h : hospitalier.

17/30 souches d'entérobactéries résistantes à la gentamicine sont d'origine du sexe féminin et 13 souches sont isolées des patients du sexe masculin. Statistiquement, les taux observés chez les deux sexes ne sont pas de différence significative. Les caractéristiques des souches résistantes à la gentamicine sont données par le tableau XLIII :

**Tableau XLIII : Caractéristiques des souches d'entérobactéries résistantes à la gentamicine.**

Code	SOUCHE	PVT	Sexe	Age	BLSE	NA	G	Tm	AK	FOX
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	U	M	A	+	R	R	S	S	S
HD31	<i>Citrobacter sp.</i>	U	M	E	+	S	R	R	S	S
A04	<i>E.coli</i>	U	F	6	S	R	R	S	S	S
DD14	<i>E.coli</i>	U	F	30	S	R	R	R	S	R
A88	<i>E.coli</i>	PUS	F	60	S	R	R	S	S	S
A84	<i>E.coli</i>	U	F	75	+	R	R	R	I	S
DD29	<i>E.coli</i>	U	F	86	S	R	R	S	S	S
DD26	<i>E.coli</i>	U	F	86	S	R	R	S	S	S
HD49	<i>E.coli</i>	U	F	A	+	S	R	R	S	S
HD40	<i>E.coli</i>	U	F	A	+	R	R	R	S	I
HD35	<i>E.coli</i>	U	F	A	S	R	R	R	S	S
HD26	<i>E.coli</i>	U	F	A	S	R	R	R	S	S
HD19	<i>E.coli</i>	U	F	A	S	R	R	S	S	S
HD54	<i>E.coli</i>	U	F	E	+	S	R	S	S	ND
A71	<i>E.coli</i>	U	M	10	S	R	R	S	S	S
A99	<i>E.coli</i>	U	M	35	+	R	R	S	S	ND
A43	<i>E.coli</i>	U	M	13M	-	R	R	S	S	R
HD27	<i>E.coli</i>	U	M	30M	+	R	R	R	S	S
HD22	<i>E.coli</i>	U	M	A	S	R	R	R	S	S
HD13	<i>E.coli</i>	U	M	A	S	R	R	S	S	S
DD24	<i>Klebsiella sp.</i>	U	F	54	S	R	R	S	S	S
HD51	<i>Klebsiella sp.</i>	U	F	A	+	S	R	R	S	R
HD44	<i>Klebsiella sp.</i>	U	F	A	S	S	R	R	S	S
A70	<i>Klebsiella sp.</i>	U	F	7	-	R	R	R	S	R
A60	<i>Klebsiella sp.</i>	U	F	17J	+	S	R	R	S	S
A102	<i>Klebsiella sp.</i>	U	M	71	+	R	R	S	S	ND
A61	<i>Klebsiella sp.</i>	PUS	M	85	+	R	R	R	R	S
A40	<i>Klebsiella sp.</i>	U	M	3M	+	R	R	S	S	S
A55	<i>Klebsiella sp.</i>	U	M	8M	+	S	R	R	S	S
A90	<i>Proteus sp.</i>	U	M	16M	S	S	R	S	S	S

S :

sensible aux C3G, + : présence BLSE, - : pas de BLSE

Il est noter d'après le tableau que, sur le nombre total des souches résistantes à la gentamicine, 22 souches sont résistantes à l'acide nalidixique et 14 souches sont productrices de BLSE.

Les tests statistiques montrent que le taux de résistance aux aminosides est significativement supérieur chez les souches de *Klebsiella sp.* tel qu'il est le cas pour la résistance aux C3G. Cependant, ils ne montrent pas une association entre les souches résistantes aux aminosides et celles productrices d'une BLSE. Ce résultat ne concorde pas

avec le résultat obtenu par Sekhsokh et *coll.* (2008), la résistance aux aminosides rapportée dans leur étude concerne surtout les entérobactéries productrices de BLSE.

Contrairement au résultat obtenu pour les BLSE, la résistance aux aminosides est liée à la résistance aux quinolones et cela peut être dû au gène *aac (6')-Ib-cr* qui est responsable, à la fois, de la résistance aux aminosides et aux quinolones.

Ce gène code pour la protéine AAC (6')-Ib-cr, une variante d'aminoglycoside acétyl transférase décrite pour la première fois en 2003. Cette variante confère une résistance aux aminoglycosides et à certaines quinolones, elle est capable de modifier la ciprofloxacine et plusieurs autres fluoroquinolones et de réduire leur activité. Cette protéine est maintenant reconnue pour être largement prévalente et circule ensemble avec le gène *qnr* (Denton, 2007 ; Jiang *et al.*, 2008).

La détermination phénotypique des mécanismes de résistance aux aminosides est faite, selon Neonakis et *coll.* (2003), selon la résistance à la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine, nétilmicine, la kanamycine, streptomycine et la néomycine.

L'enzyme AAC (3)-II, confère le phénotype KTGNt, AAC (6')-I le phénotype KTANt, ANT (2'')-I confère la résistance à KTG, APH (3')-I le phénotype KN, et les enzymes AAC (2'), AAC (3') et APH (3'') ou ANT (3'') confèrent respectivement les phénotypes GTNtNm, G et S.

Néanmoins, pour nos souches, c'est uniquement 3 aminosides qui sont testées, donc nous ne pouvons pas déterminer le phénotype exact de certaines souches.

L'enzyme AAC (3') qui confère la résistance à la gentamicine uniquement est probablement présente chez 15 de nos souches ; le phénotype KTANt conféré par l'enzyme AAC (6')-I est probablement présent chez deux souches (A84 et A61) résistantes à l'amikacine.

Enfin, pour le reste des souches, résistantes à la gentamicine et la tobramycine, plusieurs enzymes et plusieurs phénotypes sont probables : l'enzyme AAC (3)-II, conférant le phénotype KTGNt, ANT (2'')-I conférant la résistance à KTG et l'enzyme AAC (2') qui confère le phénotype GTNtNm.

La résistance par méthylation de l'ARNr 16S, cible des aminosides, est un phénotype peu probable chez nos souches d'entérobactéries car la méthylation du résidu G1405, confère des résistances de haut niveau ( $\geq 256\mu\text{g/ml}$ ) à toutes les aminosides, exceptée la streptomycine (Doi et Arakawa, 2007) alors que les CMI déterminées pour certaines de souches, résistantes aux aminosides, vont de 16 à  $>128\mu\text{g/ml}$ .

Ces souches se caractérisent par la résistance aux C3G, la résistance à l'acide nalidixique et la production de BLSE pour la majorité d'entre elles. Le tableau dessous montre leurs CMI à la gentamicine, la ciprofloxacine, la FOX et ainsi le caractère de production de BLSE.

**Tableau XLIV: Caractères des souches multi résistantes**

Code	SOUCHE	CMI de G	R/S/I	CMI de CIP	CMI de FOX Sur gélose à la cloxacilline	BLSE	D'autres phénotypes probables
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	128	R	32	S	+	-
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	128	R	32	S	+	-
A40	<i>K.pneumoniae</i>	> 128	R	S	S	+	-
A43	<i>E.coli</i>	16	R	64	2	-	Case
A84	<i>E.coli</i>	64	R	S	S	+	-
A99	<i>E.coli</i>	16	R	128	S	+	-
HD40	<i>E.coli</i>	64	R	128	16	+	IMP
HD27	<i>E.coli</i>	32	R	S	S	+	-
A102	<i>K.pneumoniae</i>	16	R	4	S	+	-
A61	<i>K.pneumoniae</i>	128	R	64	S	+	-
A70	<i>K.pneumoniae</i>	32	R	4	16	-	IMP

IMP : Imperméabilité, Case : céphalosporinase hyperproduite.

Nous avons noté d'après ce tableau que l'imperméabilité membranaire est suspectée chez deux souches multirésistantes, la souche HD40 qui produit également une BLSE et la souche A70 qui est négative pour le test de synergie.

Le phénotype BLSE est associé à la fois à la résistance aux quinolones et aux aminosides chez toutes les souches montrées par le tableau.

La plupart des souches productrices de BLSE de type CTX-M, sont non seulement résistantes à la majorité des  $\beta$ -lactamines mais également à de nombreux antibiotiques des autres familles tels que les fluoroquinolones, les aminosides, le cotrimoxazole, les tétracyclines ou encore le chloramphénicol (Ruppé, 2010). L'association de la résistance de ces molécules a été signalée par de nombreux auteurs (Lemort et al., 2006).

Les gènes mobiles *qnr* et les gènes *aac(6')-Ib-cr*, conférant la double résistance aminosides et pipérazinyl-amine-quinolone (NOR et CIP) sont fréquemment retrouvés au sein des souches productrices de CTX-M. Ces enzymes sont souvent associées à des aminosides acétylases de type AAC(3) et/ou AAC(6'), conférant la résistance à la gentamicine et la tobramycine (Ruppé, 2010).

Pour la souche A70, probablement productrice d'une oxacillinase, est également résistante à la gentamicine et à l'acide nalidixique. L'association des gènes *bla<sub>OXA</sub>* (OXA-1) et

le gène *aac(6')-Ib-cr* au sein d'une même région de multirésistance est très souvent retrouvées avec *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (Ruppé, 2010).

#### II.4. Transfert de la résistance chez les entérobactéries

Afin de déduire si les mécanismes de résistance observés chez nos souches d'entérobactéries sont transférables, un essai de transfert par conjugaison a été réalisé pour les souches : A102, A62, A100, A35, A84, A53, A99, HD12, HD06, HD27, HD40, HD51, A37, A61, HD47, A10, A40, A36. Les caractéristiques de ces souches sont illustrées par le tableau XLV :

**Tableau XLV : Caractéristiques des souches utilisées pour la conjugaison bactérienne.**

Code	SOUCHE	BLSE	NA	G	FOX
HD06	<i>Citrobacter sp.</i>	+	R	R	S
HD12	<i>Citrobacter sp.</i>	+	R	S	S
A84	<i>E.coli</i>	+	R	R	S
A99	<i>E.coli</i>	+	R	R	ND
HD27	<i>E.coli</i>	+	R	R	S
HD40	<i>E.coli</i>	+	R	R	I
A10	<i>E.coli</i>	-	R	S	R
A37	<i>E.coli</i>	+	R	S	S
A36	<i>E.coli</i>	-	R	S	R
A62	<i>E.coli</i>	+	R	S	R
A100	<i>E.coli</i>	+	R	S	R
A53	<i>E.coli</i>	+	R	S	R
A102	<i>Klebsiella sp.</i>	+	R	R	ND
A40	<i>Klebsiella sp.</i>	+	R	R	S
A61	<i>Klebsiella sp.</i>	+	R	R	S
HD51	<i>Klebsiella sp.</i>	+	S	R	R
A35	<i>Klebsiella sp.</i>	+	R	S	S

Toutes les souches donatrices ont été testées sur milieu Mueller Hinton additionné de la rifampicine à 240µg/ml, afin de s'assurer de leur sensibilité. La souche *E.coli* C600 est également testée vis-à-vis de la céftazidime à 4µg/ml.

Le transfert de la résistance n'a été obtenu que pour 5 souches d'entérobactéries : la souche A99, HD27, HD40, HD51 et A62, avec une fréquence moyenne de  $\approx 10^{-8}$  par souche donatrice.

Les transconjugants obtenus ont fait l'objet d'une ré-identification avant la recherche de BLSE, ainsi que la recherche des autres déterminants de résistance telle que la résistance à l'acide nalidixique et la résistance à la gentamicine. Le tableau XLVI montre le profil de résistance des transconjugants.

**Tableau XLVI : profils de résistances des transconjugants.**

TRC	CAZ	AMC	CTX	FOX	BLSE	BLSE chez la souche donatrice	G	NA	RA
TA99	S	S	S	S	ND	+	S	S	R
THD27	R	R	R	S	-	+	R	R	R
THD40	R	R	R	S	+	+	R	R	R
THD51	R	R	R	S	-	+	R	S	R
TA62	R	R	R	I	+	+	S	R	R

TRC : transconjugant, ND: Non déterminée, + : présence de BLSE, - :

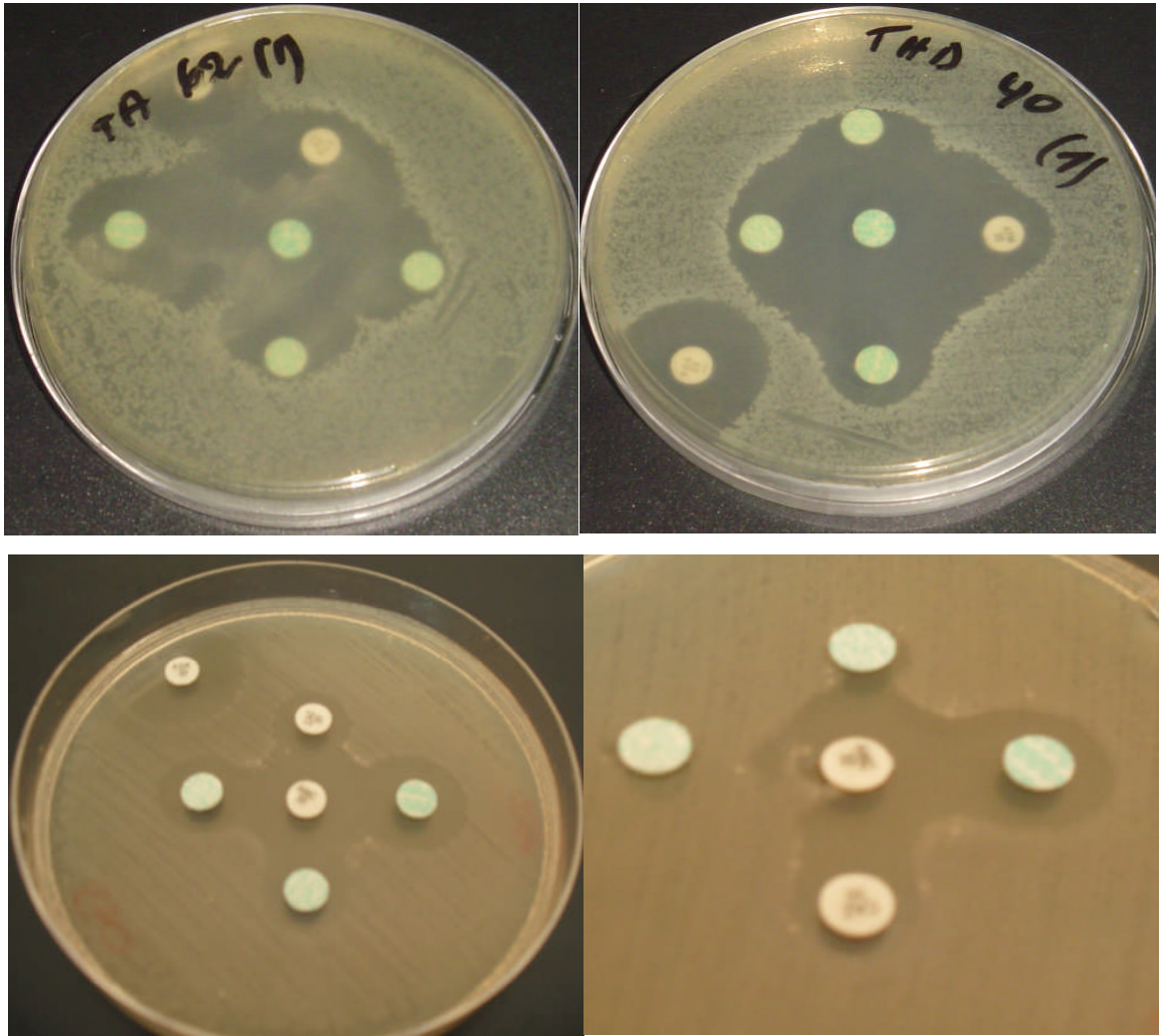
Les CMI des transconjugants obtenus ont été déterminées, par rapport à la CTX, CAZ, CIP et la gentamicine, par la même méthode effectuée pour les souches donatrices et sont comparées entre elles. Elles sont données par le tableau XLVII

**Tableau XLVII: résultats des CMI des transconjugants et leurs souches donatrices.**

CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI CTX	CMI CAZ	CMI CIP	CMI G
TA99	< 2/ <b>128</b>	S/ <b>16</b>	4/ <b>128</b>	S/ <b>16</b>
THD27	>128/ > <b>128</b>	8/ <b>16</b>	4/S	ND/ <b>32</b>
THD40	>128/ > <b>128</b>	32/ <b>32</b>	ND/ <b>128</b>	ND/ <b>64</b>
THD51	64/ <b>128</b>	64/ <b>64</b>	S/S	64/ <b>32</b>
TA62	>128/>> <b>128</b>	16/ <b>16</b>	64/ <b>64</b>	S/S

ND : non déterminé, les CMI indiquées en gras sont celles des souches donatrices.

Les déterminants de la résistance à différents antibiotiques ont été transférés pour 4 /5 souches des transconjugants. Cependant, la BLSE n'est exprimée que chez deux transconjugants (THD40 et TA62), tel qu'il est montré par la figure 29, et n'est pas exprimée chez THD27 et THD51 malgré que les souches donatrices soient productrices de cette enzyme. Pour le transconjugant TA99, le gène exprimant la BLSE est probablement transféré mais sans qu'il soit exprimé.



**Figure 29: Comparaison du DD-test effectué pour les transconjugants et leurs souches donatrices**

Nous notons d'après les profils de résistance des transconjugants que les gènes codant pour la résistance aux quinolones,  $\beta$ -lactamines et aux aminosides sont probablement portés par le même plasmide conjugatifs.

Différentes études, citées par Carrer et Nordmann (2009), ont rapporté que le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (le plus probable chez nos souches) est porté par des plasmides conjugatifs associant plusieurs autres déterminants de résistance aux antibiotiques. En Espagne, le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* est porté par un même plasmide de 180 kb associant une résistance à l'acide nalidixique et à la kanamycine. En Slovénie, un plasmide de 150 kb a été retrouvé chez toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de CTX-M-15. Il confère une résistance associée aux aminosides.

Pour nos transconjugants, la production de BLSE est associée à la résistance à l'acide nalidixique chez TA62, ce qui suggère la présence des gènes de type *qnr* associé à un gène *bla* chez cette souche. La résistance à la gentamicine au même temps que la résistance à l'acide nalidixique chez la souche THD40 suggère la présence simultanée de deux déterminants codant pour la résistance aux quinolones et aux aminosides avec le déterminant codant pour la résistance aux  $\beta$ -lactamines.

L'absence de l'image de synergie chez les souches THD51 et THD27 malgré le transfert des déterminants de la résistance est probablement due à un transfert d'un autre type de déterminant de résistance aux  $\beta$ -lactamines tel que les gènes codant pour les cases plasmidiques. La figure 30 montre le profil de résistance de ces deux transconjugants.

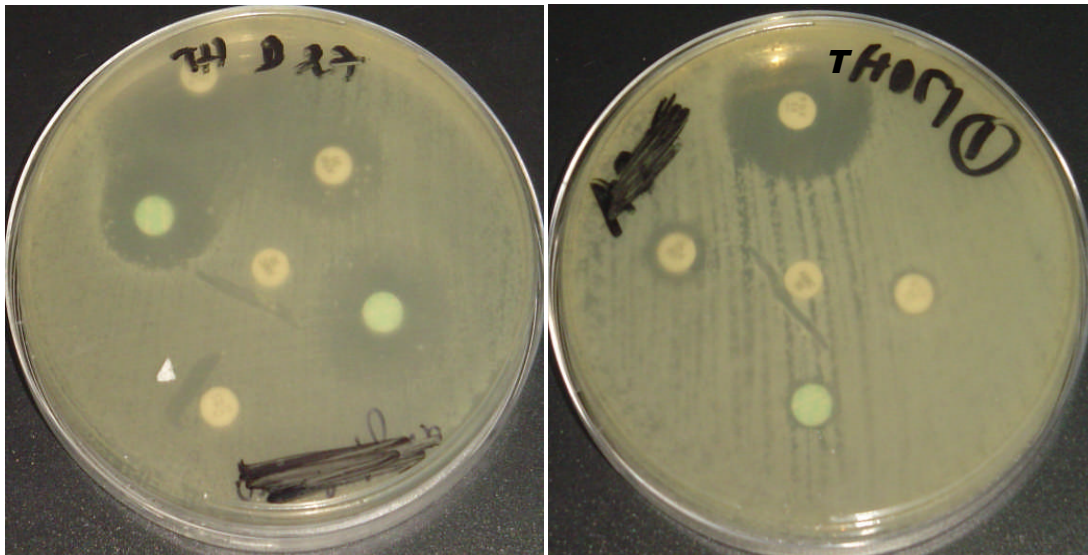


Figure 30 : DD-test effectué pour les transconjugants THD27 et THD51.



## II. Résistance chez les souches d'*Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* est un pathogène opportuniste important, responsable de sévères infections nosocomiales, notamment chez les patients des soins intensifs (Koeleman et al., 2001). Les infections causées par ce germe sont le plus souvent difficiles à éradiquer à cause de ses mécanismes de résistance intrinsèques et acquis (Jeong et al., 2006).

*A. baumannii* produit naturellement une  $\beta$ -lactamase de classe C (céphalosporinase) et une autre de classe D (Oxacillinase) qui est l'OXA-69 ; cette Oxacillinase possède une action sur quelques  $\beta$ -lactamines y compris l'IMP et le méropénème (Mansour et al., 2008).

Etant donné que ce germe est considéré un pathogène nosocomial, durant notre étude nous avons collecté uniquement quatre souches d'*Acinetobacter baumannii*. Elles sont toutes isolées des personnes adultes, d'origine urinaire et  $\frac{3}{4}$  sont du sexe masculin.

Le profil de résistance de ces souches ainsi que du mutant à l'IMP (A76M), aux  $\beta$ -lactamines, est figuré dans le tableau dessous.

**Tableau XLVIII : Profils de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux  $\beta$ -lactamines.**

Code	AM	AMC	CF	CXM	CTX	CAZ	ATM	Synergie	Synergie Cloxacilline	CPO	FEP	IMP
A76	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	S
A76M	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R
A15	S	S	S	R	S	R	R	+	/	I	R	S
HD33	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R
DD08	I	R	R	R	R	I	R	+	/	I	S	S

Le DD-test, effectué sur Mueller Hinton puis sur MH à la cloxacilline, montre que 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* sont productrices de BLSE et les 3 autres sont négatives pour le test de synergie et ne présentent aucune récupération dans les diamètres des zones d'inhibition sur gélose à la cloxacilline 250 et 500 $\mu$ g/ml.

L'absence de récupération dans les diamètres des zones d'inhibition de ces souches est probablement due à l'hyperproduction d'une AmpC chromosomique. Cette hyperproduction est due à l'insertion d'une séquence IS*Aba1* apportant des séquences promotrices fortes en amont du gène *ampC* (Mansour et al., 2008).

Pour les souches résistantes à l'IMP, la recherche d'une métallo-enzyme, que ce soit par le test de synergie ou par la méthode des disques combinés, n'a révélé aucune production

d'une M $\beta$ L. Ce test se base sur le principe que l'EDTA est un chélateur des ions bivalents et que les métallob-lactamases ont un ion Zn<sup>2+</sup> dans leur site actif.

Nos souches d'*Acinetobacter baumannii* présentent également une résistance à d'autres antibiotiques des autres familles. Le tableau dessous montre leurs profils de résistance aux quinolones, aux aminosides et à la colistine.

**Tableau XLIX: Profils de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux quinolones, aminosides et à la colistine.**

Code	NA	NOR	CIP	G	Tm	AK	CS
A76	R	R	R	R	R	R	S
A76M	R	R	R	R	R	R	S
A15	R	R	R	R	R	S	S
HD33	R	R	R	R	S	S	S
DD08	R	S	S	S	S	S	S

Nous notons d'après ce tableau que toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont résistantes à l'acide nalidixique, seulement une seule souche est sensible aux fluoroquinolones et à la gentamicine, 2/4 sont résistantes à la tobramycine, une souche est résistante à l'amikacine et aucune n'est résistante à la colistine.

Les CMI déterminées pour les souches A15, A76 et HD33 sont de 32 $\mu$ g/ml pour la CIP pour toutes ces souches. Pour la gentamicine, elles sont de 8, 64 et 128  $\mu$ g/ml pour ces souches respectivement.

Les CMI des souches résistantes à l'IMP (HD33 et A76M) sont déterminées par rapport à l'IMP, l'ATM et la CAZ en triplicata. Les résultats obtenus sont montrés par le tableau dessous.

**Tableau L: Résultats des CMI obtenues pour les souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'IMP.**

Souche	Gélose	CMI IMP $\mu$ g/ml	CMI ATM $\mu$ g/ml	CMI CAZ $\mu$ g/ml	Phénotype
A76M	ATB+ CLOXA 250	64	16	4	OXA
	ATB+ CLOXA250+ NaCl	32	16	<4	
	ATB+ CLOXA500	ND	ND	ND	
	ATB + CLOXA500+ NaCl	ND	ND	ND	
HD33	ATB + CLOXA 250	32	>64	16	OXA
	ATB + CLOXA 250+ NaCl	32	>64	8	
	ATB + CLOXA500+	ND	>128	ND	
	ATB + CLOXA500+ NaCl	ND	128	ND	

Nous remarquons d'après les CMI obtenues sur gélose à la cloxacilline puis sur gélose à la cloxacilline additionnée de NaCl à 200mM, que la résistance à l'IMP de ces souches est probablement due à la production d'une oxacillinase de type OXA-23 ou OXA-48 selon Bush et coll. (2010), ces enzymes sont habituellement inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium (NaCl) du fait de la présence du résidu Tyr dans le motif Tyr144-Gly-Asn (Héritier et al., 2003).

L'essai de transfert des déterminants de la résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* par conjugaison n'a abouti à aucun transfert ; pour les OXA à activité carbapénémase (OXA-23, ARI-1, OXA-24, OXA-25, OXA-26, et OXA-40), aucune structure de type intégron ou séquence d'insertion (IS) n'a été retrouvée dans l'environnement génétique des gènes codants. Le ou les mécanisme(s) incriminé(s) dans la mobilisation de ces gènes reste(nt) donc inconnu (s) (Philippon et Arlet, 2006).

### III. Résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif non fermentaire, aérobic strict, oxydase positive, dont l'habitat est particulièrement étendu. Il s'agit d'un microorganisme saprophyte de l'environnement, notamment au niveau de l'eau, des sols humides et des végétaux. Il est également un commensal de l'homme, en particulier au niveau intestinal (Avril et al., 1992 ; Minchella et al., 2010).

Il peut coloniser certains appareils comme l'appareil respiratoire, le tractus urinaire ou certaines plaies cutanées chroniques. De point de vue pathogénicité, *P. aeruginosa* est considérée comme une bactérie opportuniste, provoquant des infections chez des patients ayant une diminution de leur système de défense immunitaire mais également physique (Avril et al., 1992 ; Minchella et al., 2010).

Cette espèce est naturellement résistante aux C1G, C2G, CTX, CRO, cotrimoxazole, kanamycine, macrolides, cycline, chloramphénicol, quinolones de première génération, rifampicine, glycopeptides et à l'acide fusidique (Gellen et al., 2010).

Au cours de notre étude, 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été collectées, dont 10 sont d'origine urinaire, 7 de pus et une seule souche de crachat. La sex-ratio (femme/homme) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est de 1.25 dont 10 souches sont d'origine du sexe féminin et 8 souches sont du sexe masculin. La répartition des souches de *Pseudomonas aeruginosa* selon l'âge a révélé que 6 souches sont des patients de la catégorie

adulte, 4 souches sont de la catégorie >2ans-18ans, 6 souches sont de la catégorie >35->65ans et 2 chez les catégories <2ans et >18-35ans (1,1).

Les taux de résistance aux différents antibiotiques chez les souches de *P. aeruginosa*, collectées au cours de notre étude, sont faibles voire même nuls. Il est de 0% pour la CAZ, l'ATM, les C4G, l'IMP et la colistine ; de 11.11% à la ciprofloxacine et la Gentamicine ; 5.55% à la tobramycine et à l'amikacine.

Les mécanismes de résistance les plus probables chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à la gentamicine et la tobramycine, selon Pool (2005) et Mesaros et coll. (2007) , est la production de l'enzyme AAC(3)-I pour la souche résistante à la gentamicine uniquement (P98), et AAC(6')-I pour la souche résistante à la gentamicine, la tobramycine et à l'amikacine (P33). La résistance à la ciprofloxacine chez les souches P98 et P61 est probablement due à l'altération de la perméabilité membranaire due à la pompe d'efflux MexCD-OprJ.

La production d'une BLSE, conférant une résistance à la ticarcilline, la CAZ et le FEP, la céphalosporinase hyperproduite, conférant la résistance au TZP et les carbapénèmases qui donnent la résistance à l'IMP (Nordmann, 2003) n'a pas été observée chez nos souches de *P. aeruginosa*.

Notre étude qui s'est déroulée pendant la période allant du mois d'Octobre 2010 à Juin 2011, au niveau de deux laboratoires d'analyses médicales privés, nous a permis d'obtenir :

- 423 bacilles à Gram négatif dont 401 souches d'*Enterobacteriaceae*, 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et 4 *Acinetobacter baumannii*. 92,4% de ces souches est isolé du prélèvement urinaire, l'infection la plus fréquente en médecine de ville ;
- Les espèces les plus isolées durant cette étude sont les souches d'*E.coli* (307), *Klebsiella sp.* (41) et *Proteus sp.* (27). La population de laquelle nous avons isolé ces souches se caractérise par la sex-ratio de 2,58 (305 (F)/118 (M)). Les catégories d'âge les plus touchées par les infections urinaires sont les <2ans chez le sexe masculin et la catégorie > 18 à 35 ans chez le sexe féminin ;
- Les taux de résistance des souches d'entérobactéries sont de 26.43% à l'acide nalidixique, 15.96 % à la ciprofloxacine, 8.47% aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, 5.73 % aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération et 7.48% à la gentamicine ;
- Les espèces les plus touchées par la résistance aux antibiotiques sont les souches d'*E.coli*, *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.* ;
- Chez les souches d'*E.coli*, 70.35% sont résistantes à l'amoxicilline, 65,47% résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 31% sont résistantes aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération, 11% aux C2G, 6.18% aux C3G et 2.28% aux monobactames. Aucune souche résistante à l'imipénème n'est observée ;
- Chez les souches de *Klebsiella sp.*, 78% sont résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 43.9% aux C1G, 29.26% aux C2G, 21.95% aux C3G, 14.63% aux monobactames et aucune résistance n'est observée à l'imipénème ;
- Chez les souches de *Proteus sp.*, 51.85% sont résistantes à l'amoxicilline, 40.7% à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 3.7% aux C1G, 7.4% aux C2G, 3.7% aux C3G et aucune résistante n'est observée aux monobactames et à l'imipénème ;
- Chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les taux de résistance observés sont de 0% pour la CAZ, l'ATM, les C4G, l'IMP et la colistine, 11.11% à la ciprofloxacine et la Gentamicine et de 5.55% à la tobramycine et à l'amikacine ;
- Chez *Acinetobacter baumannii*, seules 2 souches sont résistantes à l'imipénème ;
- Les CMI obtenues pour la ciprofloxacine pour les souches testées dépassent 4µg/ml et n'excèdent pas 128µg/ml. Pour les β-lactamines, elles sont comprises entre 2µg/ml et >128µg/ml et elles sont toutes >16µg/ml pour la gentamicine ;

- Les taux de résistance les plus élevés sont observés chez les souches isolées des infections urinaires ;
- Les facteurs de risque déterminés, pour l'acquisition de souches résistantes aux quinolones et aux céphalosporines de troisième génération, sont le sexe masculin et l'âge avancé > de 65ans ;
- Les phénotypes de résistance les plus probables sont : la production des enzymes inactivant ou modifiant les antibiotiques, l'imperméabilité membranaire et la modification de la cible.

Le nombre de travaux réalisés et en cours de réalisation sur la résistance aux antibiotiques est très important, ce qui nous indique l'importance du danger auquel l'humanité est confrontée aujourd'hui. La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, un problème d'ordre budgétaire et écologique. La surveillance de son évolution dans le temps et dans l'espace nous permettra d'éviter plusieurs impasses thérapeutiques, de contourner à toute nouvelle surprise qui peut rendre l'arsenal des antibiotiques existants inefficace comme elle nous permettra une meilleure gestion de la prescription et de la consommation de ces molécules. L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques peut également aider dans la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes.

En perspective,

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaire, ils doivent être complétés par une série d'autres tests, beaucoup plus performants, à savoir :

Les techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables ; l'identification et la caractérisation de l'environnement et des supports génétiques responsables d'une éventuelle dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif ; l'étude cinétique des mécanismes enzymatiques et la caractérisation précise des mécanismes de résistance.

1. **Ahoyo A. T., Baba-Moussa L., Anaga A.E., Avogbe P., Missihoun T.D., Loko F., Prévost G., Sanni A., Dramane K.** Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de beta-lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. Médecine et maladies infectieuses 2007 ; **37** : 746-752.
2. **Aibinu, I. E., V. C. Ohaegbulam, E. A. Adenipekun, F. T. Ogunsola, T. O. Odugbemi, and B. J. Mee.** Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. J Clin Microbiol 2003; **41**: 2197-200.
3. **Ait el kadi M., Aghrouch M., Seffar M., El harti J., Bouklouze A., Cherrah Y., Souly K., Zouhdi M.** Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallo-B-lactamases. Médecine et maladies infectieuses 2006 ; **36** : 386-389.
4. **Akujobi and Ewuru Chica.** Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram négatif bacilli from clinical specimens in a teaching hospital in South Eastern Nigeria. Niger med 2010; **51**(4): 141-146.
5. **Albert Dromigny Jacques, Nabeth Pierre, Juergens-Behr Ann and Perrier-Gros-Claude Jean David.** Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infection in Dakar, Senegal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; **56**: 236-239.
6. **Arpin C, Dubois V, Maugein J, Jullin J, Dutith B, Brochet P-J, Larribet G, Fischer I, and Quentin C.** Clinical and molecular analysis of extended- spectrum  $\beta$ -lactamase- producing Enterobacteria in the community setting. Journal of Clinical Microbiology 2005; **43**: 5048-5054.
7. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** Bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup> ed. Ellipses, Paris ; 1992. p511.
8. **Bassetti M., Rghi E., and Viscoli C.** Novel  $\beta$ -lactam antibiotics and inhibitor combination. Expert Opin. Investing. Drugs 2008. **17**:285-296.
9. **Ben Abdallah H., Sahnoun O., Ben Romdhane F., Loussaïef C., Noomen S., Bouzouaïa N., Chakroun M., Mastouri M.** Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées dans la région de Monastir. Rev Tun Infectiol 2008 ; **02** (02) : 5-8.
10. **Ben Achour N., Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben Moussa M., Galleni M., Belhadj O.** First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxim-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. Pathologie Biologie 2009; **57**: 343-348.
11. **Ben Haj Khalifa A., Khedher M.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella spp.* Uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire Tunisien, 2009. Pathologie Biologie 2010; Article in Press.
12. **Bennett P.M.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. British Journal of Pharmacology 2008; **153**: 347-357.

13. **Bonnet. R.**  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. In: Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E, eds. ANTIBIOGRAMME, 2ème ed. ESKA, Paris; 2006. pp. 141-162.
14. **Bouzenoune F., Boudersa F., Bensaad A., Harkat F., Siad N.** Les infections urinaires à Ain M'lila (Algerie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. Médecines et maladies infectieuses 2009; **39**: 142-143.
15. **Bréaud J., Guys J.-M.** Décalottage ou circoncision : quelle indication dans le phimosis? Archives de pédiatrie 2005 ; **12**: 1424-1432.
16. **Bush Karen and Jacoby George A.** Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2010; **54** (3): 969-976.
17. **Carattoli Alessandra.** Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 2009; **53** (6): 2227-2238.
18. **Carrër A., Nordmann P.** *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Pathologie Biologie 2009 ; Article in Press.
19. **Cattoir Vincent.** Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). MAPAR 2008 : 204-209.
20. **Cavallo J-D., Fabre R., Jehi F., Rapp C., Garrabé E.**  $\beta$ -lactamines. EMC. Maladies infectieuses 2004; **1** :129-202.
21. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Projet de Norme N°2 : Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide. Communiqué 1995
22. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Communiqué 2010.
23. **Courdon P.E., Moland E.S., and Thomson K.S.** Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. Journal of Clinical Microbiology 2000; **38**: 1791-1796.
24. **Cuzon G., Naas T., Nordmann P.** carbapénèmases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique. Pathologie Biologie 2010; **58**: 39-45.
25. **De Moüy Danny, Cavallo Jean-Didier, Weber Philippe, Fabre Roland.** Détection et surveillance épidémiologique des résistances bactériennes aux antibiotiques en milieu communautaire. Revue Française des Laboratoires 2001 ; (335) : 31-36.
26. **Denton M.** *Enterobacteriaceae*. International Journal of Antimicrobial Agents 2007; **3**: 9-22.
27. **Djennane F., Mohammedi D., Tiouit D., Touati D., Rahal K.** Examen Cytobactériologique des Urines (E.C.B.U). In : Techniques Microbiologiques. Institut Pasteur. (ed). 2009, Algérie.



28. **Doi Y., Adams J.M., Yamane K., and Paterson D.L.** Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains in North America. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2007; **51** (11): 4209-4210.
29. **Doil Yohei and Arakawa Yoshichika.** 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance. Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases* 2007; **47**: 88-94.
30. **Doit C., Mariani-kurkdjian P., Bingen E.** Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. *Archives de pédiatrie* 2010; **17** :140-144.
31. **Elkharrat D., Arrouy L., Benhamou F., Dray A. and Grenet J., et al.** Monographies en urologie. *In* : Lobel B. et Sossy C-J. Les infections urinaires, Ed Springer Paris ; 2007. p1-20
32. **Fabre R., Mérens A., Lefebvre F., Epifanoff G., Cerutti F., Pupin H.** Sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires communautaires. *Médecines et maladies infectieuses* 2010; **40** : 555-559.
33. **Ferjani A., Marzouk M., Ben Moussa F., Boukadida J.** Résistance des souches *Escherichia coli* isolées de prélèvements d'origine urinaire vis-à-vis de l'association amoxicilline-acide clavulanique et divers antibiotiques. *Médecine et maladies infectieuses* 2010 ; **40**: 161-164.
34. **Ferjani A., Mkaddemi H., Tilouche S., Marzouk M., Hannechi N., Boughammoura L., Boukadida J.** Caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques des bactéries uropathogènes isolées dans un milieu pédiatrique. *Archives de pédiatrie* 2011 ; **18**: 230-234.
35. **Gellen-Dautremer J.** Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotiques* 2010 ; **12**: 75-81.
36. **Giraud-Morin C., Fosse T.** Evolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathologie Biologie* 2008; **56**: 417-423.
37. **Gniadkowski M.** Evolution of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; **14** (1): 11-32.
38. **Haab François, Costa Pierre, Colau Jean-Claude, Gérard Alain, Liard François, Bohbot Jean-Marc, Leng Jean-Joel, Lobel Bernard, Soussy Claude-James, Boulanger Patrick.** Les infections urinaires de la femme en médecine générale. *Presse Med.* 2006 ; **35**: 1235-1240.
39. **Hamouche E., Sarkis D.K.** Evolution de la sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie et biologie* 2011 ; Article in press.

40. **Héritier C., Poirel L., Aubert D., Nordmann P.** Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**(1):268-73.
41. **Hooper David C.** Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 2000; **31**: 24-28.
42. **Hopkins Katie L., Davies Robert H., Threlfall John E.** Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; **25**: 358-337.
43. **Husičková Vendula, Chromá Magdaléna, Kolár Milan, Hricová Kristýna, Štosová Tat'ana, Kantor Lumír, Dubrava Lubomír.** Analysis of ESBL- and AmpC-Positive *Enterobacteriaceae* at the Department of Neonatologie, University Hospital Olomouc. *Curr Microbiol* 2011; **62**: 1664-1670.
44. **Jacoby A.G.** Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. In: Mayers DL. (eds.), *antimicrobial Drugs Resistance*. Humana Press, 2009. P. 207-209.
45. **Jacoby A.G. and Munoz price L.S.** The new  $\beta$ -lactamases. *The New England journal of medicine* 2005; **352**: 380-391.
46. **Jacoby G.A.** Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 2005; **41**: 120-126.
47. **Jacoby G.A.** AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; **22** (1): 161-182.
48. **Jacoby G.A., Walsh K.E., Mills D.M., Walker V.J., Oh H., Robicsek A., and Hooper D.C.** *qnrB*, an other plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **50**: 1178-1182.
49. **Janvier F., Mérens A., Delaune D., Soler C., Cavallo J.-D.** Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques : évolution entre 1999 et 2009. *Pathologie Biologie* 2011 ; **59**: 97-101.
50. **Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., and Philippon A.** Extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1998; **10**: 867-878.
51. **Jeong Seok Hoon, Bae Il Kwon, Park Kwang Ok, An Young Jun, Sohn Seung Ghyu, Jang Seon Ju, Sung Kwang Hoon, Yang Ki Suk, Lee Kyungwon, Young Dongeun and Lee Sang Hee.** Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology* 2006; **44** (4): 423-431.
52. **Jiang Y., Zhou Z., Qian Y., Wei Z., Yu Y., Hu S., and Li L.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac (6')-Ib-cr* in extended  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **61**: 1003-1006.

53. **Kaul M., Barbieri C.M., Srinivasan A.R., and Pilch D.S.** Molecular Determinants of Antibiotic Recognition and Resistance by Aminoglycoside Phosphotransferase (3')-IIIa : A Calorimetric and Mutational Analysis. *J. Mol. Biol.* 2007; **369** (1): 142-156.
54. **Kazmierczak K.A., and Scott K.P.** Antibiotics and Resistance Genes: Influencing the microbial ecosystem in the gut. *Advance in applied microbiology* 2007; **62**: 269-292.
55. **Keynan Y. and Rubinstein E.** The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; **30**: 385-389.
56. **Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdroff-Neutzling R.M., Wiedemanne B.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 302-307.
57. **Koeleman Johannes G. M., Stoof Jeroen, Van Der Bijl Madelon W., Vandenbroucke-Grauls Christina M. J. E., And Savelkoul Paul H. M.** Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39**(1): 8-13.
58. **Kumar Ayush and Schweizer Herbert P.** Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; **57**: 1486-1513.
59. **Lastours de V., Fantin B.** Résistance aux fluoroquinolones en 2010 : quel impact pour la prescription en réanimation?. *Réanimation* 2010; **19** : 347 – 353 .
60. **Lavigne Jean-Philippe, Sotto Albert, Merle Corinne, Jourdan Jacques, Soussy Claude-James, Sirot Danielle.** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêta-lactamines et prévalence en Clinique. *Pathol Biol* 2002 ; **50**: 388-393.
61. **Le Minor, C., and C. Richard.** Notes techniques. *In* : Méthode de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur (eds) 1993, Paris.
62. **Lemort M.-L., Neuville S., Medus M., Guedet P., Saada M., Aumaître H., Lecaillon E.** Evolution comparée de la sensibilité de souches de *Escherichia coli* isolées d'infections urinaires de patients consultant aux urgences et de patients hospitalisés en 2002 et 2004 à l'hôpital de Perpignan. *Pathologie Biologie* 2006 ; **54** : 427-430.
63. **Li X-Z.** Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanism. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; **25**: 453-463.
64. **Maharnal A., Daurès J.P., Sotto A.** Evaluation de la relation consommation de fluoroquinolones et émergence de résistance chez *E. coli* : rôles respectifs et comparatifs des études observationnelles et quasi expérimentales. *Médecine et maladies infectieuses* 2005 ; **35** : 543-548.

65. **Mammeri H., Loo V.D., Poirel L., Martinez-Martinez L. and Nordman P.** Emergence of plasmid-mediated Quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **49**: 71-76.
66. **Mammeri H., Loo V.D., Poirel L., Martinez-Martinez L. and Nordman P..** Emergence of plasmid-mediated Quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **49**: 71-76.
67. **Manchanda V. and Singh P.N.** Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among Gram- negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Teg Bahadur Hospital, Delhi, India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **51**: 415-418.
68. **Mansour W., Bouellegue O., Dahmen S., Boujaafar N.** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie(2005). *Pathologie Biologie* 2008 ; **56**: 116-120.
69. **Martinez-martinez L.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; **14** (1): 82-89.
70. **McDermott Patrick F., Walker Robert D., and White David G.** Antimicrobials: Modes of Action and mechanisms of Resistance. *International journal of Toxicology* 2003, **22**: 135-43.
71. **Megalhães Maria L. and Blanchard John S.** Aminoglycosides: Mechanisms of Action and Resistance. In: Mayers DL. (eds.),. *Antimicrobial Drug Resistance*. Humana Press, 2009. p. 171-181.
72. **Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J.-D., Timinouni M.** Résistance aux quinolones de types *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* chez les entérobactéries. *Pathologie Biologie* 2009 ; Article in Press.
73. **Mérens Audrey, Servonnet Aurélie.** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 ; **33** (422) : 33-41.
74. **Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P. M., Van Bambeke F.** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques* 2007; **9**: 189-198.
75. **Minchella A., Molinari L., Alonso S., Bouziges N., A. Sotto, Lavigne J.-P.** Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie* 2010 ; **58** : 1-6.
76. **Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y. and Tulkens P.M.** Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 1999; **43** (4): 727-737.
77. **Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S., Hammami A.** Etude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans

- les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999-2005). Médecine et maladies infectieuses 2008 ; **38**: 293-298.
78. **Moellering Robert C., Graybill John R., McGowan John E., and Corey Lawrence.** Antimicrobial resistance prevention initiative an update: Proceedings of an expert panel on resistance. AJIC 2007; **35** (9): 1-23.
79. **Moland Ellen Smith, Kim Soo-Young, Hong Seong Geun, and Thomson Kenneth S.** Newer  $\beta$ -lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part II. Clinical Microbiology Newsletter 2008; **30** (11): 79-85.
80. **Moudgal Varsha V. and Kaatz Glenn W.** Fluoroquinolone Resistance in Bacteria. In: Mayers DL. (eds.), Antimicrobial Drug Resistance. Humana Press, 2009.p. 195-205.
81. **Muratani Tetsuro, Matsumoto Tetsuro.** Urinary tract infection caused by fluoroquinolone-and cephem-resistant Enterobacteriaceae. International Journal of Antimicrobial Agents 2006; **28S**: 10-13.
82. **Naas T., Poirel L. and Nordmann P.** Minor extended-spectrum- $\beta$ -lactamases. Clinical Microbiology and infection 2008; **14** (1):42-52.
83. **Nadkarni Adhijeet S., Schliep Tjark, Khan Lamia, and Zeana Cosmina B.** Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. Am J Infect Control 2009; **37**: 121-126.
84. **Nadmi H., Elotmani F., Talmi M., Zerouali K., Perrier-Gros-Claude J. D., Timinouni M.** Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). Médecine et maladies infectieuses 2010; **40**: 303-305.
85. **Neonakis I., Gikas A., Scoulica E., Manios A., Georgiladakis A., Tselentis Y.** Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. International Journal of Antimicrobial Agents 2003; **22**: 526-531.
86. **Nicolau DP.** Carbapenems: a potent class antibiotic. Expert. Opin. Pharmacother 2008; **9** (1):23-37.
87. **Nicoletti Joëlle, P. Kuster Stefan, Sulser Tullio, Zbinden Reinhard, Ruef Christian, Ledergerber Bruno, Weber Rainer.** Risk factors for urinary tract infections due to ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in a tertiary care urology department in Switzerland. Swiss Med Wkly 2010; **140** (13059): 1-8.
88. **Nikaido Hiroshi.** Multidrug Resistance in Bacteria. Annu Rev Biochem 2009; **78**: 119-146.
89. **Nordmann P.** Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 2003; **22** : 527-530.
90. **Nordmann P., Mammeri H.** Résistance plasmidique aux quinolones. Antibiotiques 2007 ; **9** : 246-253.

91. **Nordmann Patrice and Poirel Laurent.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **56**: 463-469.
92. **Nseir S., Ader F., Marquette C.-H., Durocher A.** Impact de l'utilisation des fluoroquinolones sur l'émergence des bactéries multirésistantes. *Pathologie Biologie* 2005; **53**: 470-475.
93. **Paterson David L. and Bonomo Robert A.** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; **18** (4):657-686.
94. **Paterson David L.** Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *AJIC* 2006; **34** (5): 20-28.
95. **Philippon A., Arlet G.**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin* 2006 ; **64** (1): 37-51.
96. **Philippon Alain, Arlet Guillaume, and Jacoby George A.** Plasmid-Determined AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46** (1): 1-11.
97. **Pitout Johann D. D., Gregson Daniel B., Church Deirdre L., and Laupland Kevin B.** Population-based Laboratory Surveillance for AmpC  $\beta$ -Lactamase-producing, *Escherichia coli*, Calgary. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13** (3): 443-448.
98. **Pitout Johann D. D., Nordmann P., Laupland Kevin B. and Poirel L.** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; **56**: 52-59.
99. **Ploy M.-C., Gassama A., Chainier D., Denis F.** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2005 ; **20** :343-352.
100. **Poirel L., Le Thomas I., Karim A., Nordmann P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44** (3): 622-632.
101. **Poirel L., Naas T., and Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; **14** (1): 75-81.
102. **Poirel L., Weldhagen GF., Naas T., De Champs C., Dove MG., Nordmann P.** GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45** (9): 2598-2603.
103. **Poole Keith.** Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005: 479-487.
104. **Pournaras S., Markogiannakis A., Ikonomidis A., Kondyli L., Bethimouti K., Maniatis A. N., Legakis N. J. and Tsakris A.** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; **57**: 557-561.

105. **Prère M.-F., Licznar P., Decramer S., Fayet O.** *Escherichia coli* des infections urinaires et pyélonéphrites aiguës en pédiatrie : 1% des souches sont résistantes à certaines céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. *Pathologie Biologie* 2004; **52**: 497-500.
106. **Queenan A.M. And Bush K.** Carbapenemase: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Rev.* 2007; **20** (3): 440-458.
107. **Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M. F. K., Aboun A., Ammari H.** standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine. Institut Pasteur. (ed.) 2008, Algérie.
108. **Rasmussen J.W. And Hoiby N.** Classe A carbapenemases. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 2007; **60**: 470-482.
109. **Raymond S., Bourdelin M., Becker M., Henon T., Patry I., Leroy J., Limat S.** Antibiothérapie chez le sujet âgé : impact d'une démarche d'évaluation des pratiques professionnelles. *Médecine et maladies infectieuses* 2011 ; Article in Press.
110. **Référentiel en microbiologie médicale (REMIC).** Par le groupe Rémic de la SFM.2M2 - Edition et communication 2004.
111. **Robberts F. J. L., Kohner P. C., and Patel R.** Unreliable Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Detection in the Presence of Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2009: 358-361.
112. **Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C.** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 629-669.
113. **Rodríguez-Martínez J.-M., Poirel L., Nordmann P.** Ceftazidime-resistant *Klebsiella oxytoca* producing an OXY-2-type variant from Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; **32**: 278-286.
114. **Rodríguez-Villalobos H., Struelens M.-J.** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implication pour le réanimateur. *Réanimation* 2006 ; **15** : 205-213.
115. **Rossolini G. M., D'Andrea M. M. and Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal Compilation* 2008; **14** (1): 33-41L.
116. **Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **51**:1109-1117.
117. **Ruppé E.** Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotique* 2010 ; **12** : 3-16.
118. **Sekhsoh Y., Chadli M., El Hamzaoui S. A.** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et maladies infectieuses* 2008 ; **38** : 324-327.
119. **Skurnik D.** Les intégrons : structure et épidémiologie. *Antibiotiques* 2009 ; **11** :116-129.
120. **Skurnik D., Andremont A.** Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. *Réanimation* 2006 ; **15** : 198-204.

121. **Sotto Albert, De boever Corinne Merle, Fabbro-Peray Pascale, Gouby Anne, Sirot Danielle, Jourdon Jacques.** Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infections: a Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39** (2): 438-444.
122. **Soussy C.J.** Quinolones et bactéries à Gram négatif. In: Courvalin P, Leclerc R et Bingen E. (ed.), *ANTIBIOGRAMME*, 2ème ed. ESKA, Paris ; 2006. p. 263-275.
123. **Strateva T. and Yordanov D.** *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical Microbiology* 2009; **58**: 1133-1148.
124. **Tagajdid M.R., Boumhil L., Iken M., Adnaoui M., Benouda A.** Etude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Médecine et maladies infectieuses* 2010 ; **40** : 70-73.
125. **Talon D., Lallemand-De-Conto S., Thouverez M., Bertrand X.** *Escherichia coli* : résistance aux quinolones et aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques isolées en Franche-Comté. *Pathologie Biologie* 2004; **52**: 76-81.
126. **Tenover Fred C.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *AJIC* 2006; **34** (5): 3-10.
127. **Thibaut S., Caillon J., Huart C., Grandjean G., Lombrail P., Potel G., Ballereau F., Microbiology laboratories of the pays de la Loire Region.** Susceptibility to the main antibiotics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains identified in community acquired infections in France (MedQual, 2004-2007). *Médecine et maladies infectieuses* 2010; **40**: 74-80.
128. **Tran J.H. And Jacoby G.A.** Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS* 2002; **99** (8): 5638-5642.
129. **Velasco C., Rodríguez-Martínez J.M., Briales A., De Alba Díaz P., Calvo J. and Pascual A.** *Smaqnr*, a new chromosome- encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 239-242.
130. **Wachinon J., Shibayama K., Kurokawa H., Kimura K., Yamane K., Suzuki S., Shibata N., Ike, Ike Y. and Arakawa Y.** Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m<sup>1</sup>A1408. Methyltransferase. NpmA Found in a Clinically Isolated *E.coli* Strain Resistance to Structurally Diverse Aminoglycosides. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2007; **51** (12):4401-4409.
131. **Yamane Kunikazu, Wachino Jun-ichi, Doi Yohei, Kurokawa Hiroshi and Arakawa Yoshichika.** Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. *Emerging Infectious Diseases* 2005; **11** (11): 951-953.
132. **Yamane Kunikazu, Wachino Jun-ichi, Suzuki Satowa, Kimura Kouji, Shibata Naohiro, Kato Haru, Shibayama Keigo, Konda Toshifumi and Arakawa Yoshichika.** New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in



an *Escherichia coli* Clinical Isolate. Antimicrobial agents and chemotherapy 2007; **70** (9):3354-3360.

133. **Yanat B.** Evaluation de la sensibilité aux quinolones et aux fluoroquinolones des souches d'entérobactéries isolées au niveau de quelques laboratoires d'analyses médicales de la région de Béjaïa. [Mémoire de Magister]. Université de A/Mira ; 2009.p.1-67.
134. **Yoneyama H. and Katsumata R.** Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. Biosci. Biotechnol. Biochem 2006; **70** (5) 1060-1075.
135. **Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., and Chong Y.** Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo  $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* Journal of Clinical Microbiology 2002; **40** (10): 3798–3801.
136. <http://www.lahey.org/qnrStudies/>
137. <http://www.lahey.org/Studies/>
138. <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>



## ANNEXE II.

### 1.1. Prélèvement des urines

#### ➤ *Cas général habituel (recueil dit "à la volée" ou "du milieu de jet")*

Après lavage hygiénique des mains et désinfection du méat urinaire au Dakin, les premiers jets d'urines sont éliminés puis environ 10 ml d'urines sont recueillies dans un flacon stérile en prenant soin de ne pas toucher le bord supérieur du flacon. Fermer hermétiquement le flacon et le porter immédiatement au laboratoire (REMIC, 2004).

#### ➤ *Prélèvement chez le nourrisson*

Chez l'enfant, un collecteur stérile spécifique est utilisé. Ce dispositif à usage unique adapté à l'anatomie se pose après désinfection soigneuse du périnée. Dès la miction terminée, le collecteur est ôté et les urines sont transvasées soigneusement dans un flacon stérile puis acheminées rapidement vers le laboratoire (REMIC, 2004).

#### ➤ *Prélèvement chez le malade porteur d'une sonde à demeure*

Chez le patient porteur d'une sonde urinaire, il ne faut en aucun cas prélever dans le sac collecteur ni rompre le caractère clos du système de drainage vésical en déconnectant la sonde du sac collecteur pour prélever les urines. Le recueil est effectué par ponction à l'aide d'une seringue dans la paroi de la sonde après désinfection (REMIC, 2004)

### 1.2. Prélèvement de selles

Les prélèvements peuvent être à visé diagnostique ou écologique. Les selles sont recueillies dans un pot hermétique propre à usage unique. Le prélèvement est immédiatement acheminé au laboratoire (REMIC, 2004).

### 1.3. Prélèvement du sperme

Le patient éjacule un volume de sperme dans un pot stérile (REMIC, 2004).

### 1.4. Prélèvement de pus

Après avoir désinfecté la plaie, le prélèvement s'effectue sur la suppuration superficielle par un écouvillon stérile (REMIC, 2004).

### 1.5. Prélèvement des expectorations

Ce prélèvement doit être effectué le matin, dès la première heure de réveil. Après avoir rincé la bouche à l'eau, le patient récupère plusieurs expectorations dans un pot stérile

par un effort de toux. Il doit obtenir dans le pot le mucus bronchique et non pas la salive de l'arrière gorge (REMIC, 2004).

### **2.1. Isolement à partir des urines**

Il consiste à ensemercer, à partir des urines homogénéisées, le milieu de culture par la méthode des stries d'épuisement à l'aide d'un inoculateur calibré de 1ml. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

### **2.2. Isolement à partir des selles**

Une noix de la selle est dissociée dans 5 ml d'eau physiologique. Après décantation, la gélose Hektoen estensemencée par la méthode des stries d'épuisement à l'aide d'une öse, puis la culture est incubée 24h à 48h à 37°C.

### **2.3. Isolement à partir du sperme**

Une öse du sperme estensemencée sur la gélose de sélection. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24h à 48h.

### **2.4. Isolement à partir du pus**

L'écouvillon est déchargé sur la gélose puis, l'ensemencement est effectué par stries à l'aide d'une öse. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h.

### **2.5. Isolement à partir des expectorations**

Une öse du crachat est prélevée et elle estensemencée par strie sur la gélose. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h à 48h.

### ANNEXE III.

#### Composition des milieux de culture (en g/L) Hektoen, EMB ou BCP

##### Gélose EMB

Peptone	10	g
Lactose	10	g
Phosphate bipotassique	2	G
Eosine	0.4	G
Bleu de méthylène	0.065	G
Gélose	15	G
pH	7.1	

##### Gélose Hektoen

Protéose peptone	12	G
Extrait de levure	3	G
Chlorure de sodium	5	G
Thiosulfate de sodium	5	G
Sels biliaires	9	G
Citrate de fer ammoniacal	1.5	G
Salicine	2	G
Lactose	12	G
Saccharose	12	G
Fuchsine acide	0.04	G
Bleu de bromothymol	0.065	G
Agar	14	G
pH	7.5	

##### BCP

Peptone	5	G
Extrait de viande	5	G
Lactose	3	G
Pourpre de bromocrésol	10	G
Agar	0.025	G
pH	7	G

##### Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300	G
Hydrolysate de caséine	17,5	G
Amidon	1,5	G
Agar	17	G

pH 7.4

### **Bouillon Trypticase soja**

Peptone tryptique de caséine	17	
Peptone papainique de soja	3	G
Chlorure de Sodium	5	G
Phosphate bipotassique	2	G
Glucose	2	G

pH 7.3

### **Milieu Urée-Indole**

L-tryptophane	3	G
Phosphate monopotassique	1	G
Phosphate bipotassique	1	G
Chlorure de sodium	5	G
Urée	20	G
Alcool à 90°	10	MI
Rouge de phénol	0.025	G

pH 7

### **Milieu Clark-Lubs**

Peptone tryptique de viande	5	G
Phosphate bipotassique	5	G
Glucose	6	G

pH 7

### **Milieu de Citrate de Simmons**

Citrate de sodium	2	G
Chlorure de sodium	5	G
Sulfate de magnésium	0.2	G
Phosphate monoammoniaque	1	G
Phosphate bipotassique	1	G
Bleu de bromothymol	0.08	G

Agar	15	G
	pH 7.0-7.2	

### **Kligler-Hajna**

Extrait de viande de bœuf	3	G
Extrait de levure	3	G
Peptone (riche en lysine)	20	G
NaCl	5	G
Citrate ferrique	0.3	G
Thiosulfate de sodium	0.3	G
Lactose	10	G
Glucose	1	G
Roue de phénol solution à 1%	5	MI
Agar	12	G
	pH 7.4	

### **Gélose TSI**

Extrait de viande de bœuf	3	G
Extrait de levure	3	G
Peptone tryptique	20	G
Chlorure de sodium	5	G
Citrate ferrique	0.3	G
Thiosulfate de sodium	0.3	G
Lactose	10	G
Glucose	1	G
Saccharose	10	G
Rouge de phénol	0.05	G
Agar	12	G
	pH 7,4	

### **Bouillon nitraté**

Bouillon nutritif	1L
Nitrate de potassium	1g

## ANNEXE IV

Tableau de lecture de la galerie

Tests	Composant actif	Réaction/enzyme	Résultats	
			-	+
ONPG	2-nitrophényl- βDgalactopyranoside	β-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Fermentation ou oxydation du glucose	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation ou oxydation d'arabinose	Bleu/bleu vert	Jaune
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylases	Jaune	Rouge/orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
[CIT]	Trisodium citrate	Utilisation de citrate	Vert pâle/ jaune	Bleu-vert/ bleu
H2S	Sodium thiosulfate	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir
URE	Urée	Urease	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat*	
			Jaune	Marron rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	Kovacs /immédiat	
			Incolore	Rose
OX	/	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet
NO2	Tube de GLU	Production de NO2	NIT 1+NIT 2 /2-5mn	
			Jaune	Rouge

NIT1 : acide sulfanilique ; NIT2 : α Naphtylamine.



**ANNEXE V**  
**Profile numérique d'identification des souches.**

	ONPG	GLU	ARA	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u> CIT </u>	H <sub>2</sub> S	<u>URE</u>	TDA	IND	OX	NO <sub>2</sub>
<i>E.coli</i>	1(+)	2(+)	4(+)	1(+)	2(+)	0 (-)	0(-)	0(-)	0(-)	1(+)	0(-)	4(+)
	<b>7</b>			<b>3</b>			<b>0</b>			<b>5</b>		
<i>E.claooaceae</i>	1	2	4	0	2/0	4	1	2	4	0	0	4
	<b>7</b>			<b>6/4</b>			<b>7</b>			<b>4</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	1	2	4	1	0	4	0	0	0	0	0	4
	<b>7</b>			<b>5</b>			<b>0</b>			<b>4</b>		
<i>P. mirabilis</i>	0	2	0	0	2	4/0	1	2	4	0	0	4
	<b>2</b>			<b>6/2</b>			<b>7</b>			<b>4</b>		

**ANNEXE VI**  
**Diamètres des zones édités par le CFA-SFM, 2010.**

Antibiotique	Abréviation	Charge µg/ml	Ø critique (mm)		Concentration critique µg /ml	
			S	R	S	R
Amoxicilline	AX	25	≥21	<16	≤ 4	> 8
Amoxicilline/ Clavulanate	AMC	20 /10	≥21	<16	≤ 4/2	> 8/2
Céfuroxime	CXM	30	≥22	<22	≤ 8	> 8
Céfotaxime	CTX	30	≥26	<23	≤ 1	> 2
Céftazidime	CAZ	30	≥26	<19	≤ 1	> 8
Céfépime	FEP	30	≥24	<17	≤ 1	> 8
Cefpirome	CPO	30	≥24	<17	≤ 1	> 8
Aztréonam	ATM	30	≥27	<21	≤ 1	> 8
Imipénème	IMP	10	≥24	<17	≤ 2	> 8*
Acide nalidixique	NA	30	≥20	<15	≤ 8	> 16
Ciprofloxacine	CIP	5	≥25	<22	≤ 0.5	> 1
Norfloxacine	NOR	5	≥25	<22	≤ 0.5	> 1
Gentamicine	GEN	15 (10UI)	≥18	<16	≤ 2	> 4
Tobramycine	Tm	10	≥18	<16	≤ 2	> 4
Amikacine	Ak	30	≥17	<15	≤ 8	> 16
Colestine	Col	50	≥15	<15	≤ 2	> 2

## ANNEXE VII Préparation de l'EDTA.

La solution d'EDTA (MM = 372,24 g/mol) à 0.5 M (mol/l) est préparée par dissolution de 186.1 g de poudre d'EDTA- 2H<sub>2</sub>O disodique dans 1 000 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 8.2 en utilisant une solution de NaOH et stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.

### Préparation du NaCl à 200 mM.

La solution de NaCl (MM= 58.5 g/mol) à 200 mM est préparée par dissolution de 11.7 g de NaCl dans 1000 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 7.2 stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.

### Préparation du tampon phosphate à 0.01 M, pH 7.2 (pKa =7.2)

$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \rightarrow \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = 0 \rightarrow \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = 10$  et  $[\text{A}^-] + [\text{HA}] = 0.01$   
 $\rightarrow 10[\text{HA}] = [\text{A}^-] \rightarrow 11 [\text{HA}] = 0.01 \rightarrow [\text{HA}] = 9.1 \cdot 10^{-4} \text{ M} ; [\text{A}^-] = 9.09 \cdot 10^{-3}$ .

Dont  $[\text{A}^-] = [\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$  (MM=358.13g/mol) et  $[\text{HA}] = [\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  (MM=156.01g/ml).

$C = n/V \rightarrow CV = n$  et  $n = m/M \rightarrow CV = m/M \rightarrow m = CVM$

$\rightarrow m \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 9.09 \cdot 10^{-3} \cdot 100 \text{ ml} \cdot 10^{-3} \cdot 358.13$ .

$\rightarrow m \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 0.324 \text{ g}$ .

$\rightarrow m \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 9.1 \cdot 10^{-4} \cdot 100 \text{ ml} \cdot 10^{-3} \cdot 156.01$ .

$\rightarrow m \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0.014 \text{ g}$ .

La solution de tampon phosphate à 0.01 M (mol/l), pH 7.2 est préparée par dissolution de 0.324 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O et 0.014 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O dans 100 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 7.4 stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.

## ANNEXE VIII

Réalisation de la gamme d'antibiotique pour un volume final de 100 ml du Mueller Hinton pour un antibiotique à 2mg/ml (CIP, CAZ).

<b>Concentration final en ATB (µg/ml)</b>	2	4	8	16	32	64	128
<b>Volume de la solution d'ATB (ml)</b>	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
<b>Volume de Mueller Hinton en (ml)</b>	99.9	99.8	99.6	99.2	98.4	96.8	93.6

Pour la gentamicine à 40 mg/ml → 2 mg/ml (1ml de la solution à 40 mg/ml dans 19 ml de l'eau distillée stérile).

Pour le CTX à 100 mg/ml → 2mg/ml (1ml de la solution à 100 mg/ml dans 49 ml de l'eau distillée stérile).

Pour le céfépime et la céfoxitine, à 20 mg/ml → 2 mg/ml (1ml de la solution à 20 mg/ml dans 9 ml de l'eau distillée stérile).

Pour l'aztréonam à 1mg/ml.

<b>Concentration final en ATM (µg/ml)</b>	2	4	8	16	32	64	128
<b>Volume de la solution d'ATM (µl)</b>	20	40	80	160	320	640	1280
<b>Volume de Mueller Hinton en (ml)</b>	99.98	99.96	99.92	99.84	99.68	99.36	98.72

Pour l'imipénème à 320 µg/ml et 80 ml de Mueller Hinton

<b>Concentration final en IMP (µg/ml)</b>	4	8	16	32	64
<b>Volume de la solution d'IMP (ml)</b>	1	2	4	8	16
<b>Volume de Mueller Hinton en (ml)</b>	79	78	76	72	64

Pour la gélose à la cloxacilline 250µg/ml et 500µg/ml. La solution mère est à 20mg/ml.

Pour 20ml de Mueller Hinton il faut 250µl de la solution mère de la cloxacilline et pour 500µg/ml, il faut 500 µl.

**ANNEXE IX**

<b>Code</b>	<b>NIT</b>	<b>IND</b>	<b>URE</b>	<b>TDA</b>	<b>LAC</b>	<b>GLU</b>	<b>H2S</b>	<b>GAZ</b>	<b>CITR</b>	<b>RM</b>	<b>VP</b>	<b>MAN</b>	<b>MOB</b>	<b>SAC</b>	<b>OXY</b>	<b>SOUCHE</b>
HD01	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>P. vulgaris</i>
HD02	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>M. morgani</i>
HD06	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>C. Koseri</i>
HD10	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD12	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>C. Koseri</i>
HD13	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD15	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
HD19	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>E.coli</i>
HD20	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	/	-	<i>K. oxytoca</i>
HD22	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD23	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD25	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>K. oxytoca</i>
HD26	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD27	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD29	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>K. oxytoca</i>
HD30	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>K.pneumoniae</i>
HD33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>A. baumannii</i>
HD35	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD36	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD38	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD31	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	<i>C. Koseri</i>
HD37	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD38	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>

<b>Code</b>	NIT	IND	URE	TDA	LAC	GLU	H2S	GAZ	CITR	RM	VP	MAN	MOB	SAC	OXY	<i>SOUCHE</i>
HD40	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>E.coli</i>
HD41	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
HD42	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD43	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD44	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
HD46	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD48	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD49	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD51	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
HD53	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD54	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD55	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD56	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
HD57	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>C. Koseri</i>
A04	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A06	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A08	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A10	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. baumannii</i>
A27	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A30	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A31	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A32	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>

Code	NIT	IND	URE	TDA	LAC	GLU	H2S	GAZ	CITR	RM	VP	MAN	MOB	SAC	OXY	SOUCHE
A34	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A35	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A36	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A37	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A38	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A40	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A41	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>C. freundii</i>
A42	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A43	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A44	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	/	-	<i>K.pneumoniae</i>
A47	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A49	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A50	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A51	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A52	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A53	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	/	-	<i>E.coli</i>
A54	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	/	-	<i>K.pneumoniae</i>
A55	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A56	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. oxytoca</i>
A57	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A59	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A60	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A61	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A62	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A63	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>

Code	NIT	IND	URE	TDA	LAC	GLU	H2S	GAZ	CITR	RM	VP	MAN	MOB	SAC	OXY	SOUCHE
A65	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A66	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A67	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A70	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A71	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A74	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. baumannii</i>
A79	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A80	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A81	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A82	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A83	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A84	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A86	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A87	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	/	-	<i>Serratia sp.</i>
A100	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A99	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	<i>E.coli</i>
A101	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae</i>
A102	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae</i>



## **Résumé :**

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique de plus en plus grave en Algérie touchant aujourd'hui le milieu communautaire autant que le milieu hospitalier. Notre étude a pour objectif la caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, aux quinolones et aux aminosides et la détermination de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les BGN.

Au total, nous avons collecté 423 bacilles à Gram négatif, dans deux laboratoires d'analyses médicales privés de la wilaya de Béjaïa. Les entérobactéries sont les plus collectées (401 souches) au cours de notre étude, suivies par *Pseudomonas aeruginosa* avec 18 souches et 4 *Acinetobacter baumannii*. Les taux de résistance des souches d'entérobactéries sont de 26.43% à l'acide nalidixique, 15.96 % à la ciprofloxacine, 8.47% aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, 5.73% aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération, 7.48% à la gentamycine et aucune résistance n'est observée pour l'imipénème. Chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les taux de résistance observés sont de 0% pour la CAZ, l'ATM, les C4G, l'IMP et la colistine, 11.11% à la ciprofloxacine et la Gentamicine et de 5.55% à la tobramycine et à l'amikacine. Pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*, deux souches sont résistantes à l'imipénème.

**Mots clés :** résistance aux antibiotiques, bacilles à Gram négatif, communautaire, nouveaux mécanismes de résistance.

**Abstract:**

Antibiotic resistance is now a major public health threat. The dissemination of resistance among Gram negative bacteria is increasingly important. The aim of this survey is to characterize new mechanisms of resistance and to evaluate the prevalence of resistance to  $\beta$ -lactams, quinolones, and aminoglycoside antibiotics among Gram negative bacilli recovered from community.

During our study, 423 Gram negative bacilli were collected from medical laboratories analysis. 401 strains are *Enterobacteriaceae*, 18 strains are *Pseudomonas aeruginosa* and only 4 strains are *Acinetobacter baumannii*. Rates of antibiotics resistance in *Enterobacteriaceae* are 26.43% to nalidixic acid, 15.96 % to ciprofloxacin, 8.47 % to the third generation of cephalosporins, 5.73% to the fourth generation of cephalosporins, 7.48% to gentamycin and none to carbapenem. No resistance is observed in *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidim, to aztreonam, to the fourth generation of cephalosporins, carbapenem and colistin. A rate of 11.11% is observed to ciprofloxacin and gentamycin. Finally, 5.55% are resistant to tobramycin and amikacin. Only to strains of *Acinetobacter baumannii* are resistance to imipenem.

**Key words:** Resistance to antibiotics, Gram negative bacilli, community, new mechanism of resistance.

## متخص

خلال مرحلة دراستنا الممتدة على مدة 7 اشهر، تم عزل 423 بكتيرية ذات الكولورسيو الغرام السالب حيث 401 من عائلة الانتروبيكتيرية، 18 من نوع البسودوموناس و 4 من الاسينتوبكتر بوماني . تعد نسبة المقاومة المضادات الحيوية من بين الانتروبيكتيرية لعائلة الكينولون ب 26.43 % لحمض ناليديكسيك و 15.96% بالنسبة للسيبروفلوكساسين ، 8.47 بالنسبة للسيفالوسبورين من الجيل الثالث و 7.48 بالنسبة للجونتاميسين . قدرت نسبة المقاومة عند نوعية البسودوموناس ب 11.11 لسبروفلوكساسين والجنتاميسين و لم يتم تسجيل أي مقاومة للسفتازديم ، المونوباكتام، السيفالوسبورين من الجيل الرابع ، الامينام و الكولستين. نضم المقاومة ضد هذه المضادات الحيوية في معظم الأحيان بأنتاج أنزيمات محللة لهذه المضادات.