

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

**Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen**



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

**Département de Biologie**

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au  
Biomédical et à l'Environnement

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien

**THEME**

**Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries  
à Gram négatif non fermentantes au niveau du  
C.H.U de Tlemcen**

Présenté par

***Melle Liazid Asma***

Devant le jury composé de

*Mr MOUSSA BOUDJEMAA B., Professeur à l'Université de Tlemcen*

Président

*Mme HASSAINE H., Maitre de Conférence de Classe A à l'Université de Tlemcen*

Examineur

*Mr ABDELOUAHID D.E., Professeur à l'Université de Tlemcen*

Examineur

*Mr Drissi M., Maitre de Conférence à l'Université de Tlemcen*

Promoteur

***Année universitaire : 2011-2012***

*Je dédie cet humble travail*

*A*

*ALLAH le tout puissant à qui je dois tout.*

*Mes très chers parents*

*Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille*

*Je les remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours*

*Mes frères et sœurs, Que ce travail les incite à mieux faire et qu'il soit un faible  
témoignage de l'affection de leur grande sœur*

*Mes oncles, pour leur aide et encouragement sans cesse*

*Tous mes camarades de promotion : Khadija, Asma, Karima, Rachida, Mohammed,*

*Amine et Omar*

*Mes collègues du laboratoire : Imene, Esma, Djahida, Téma et Amel, pour les moments  
inoubliables passés ensemble et pour leur soutien.*

# **REMERCIEMENTS**

*Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques » de l'Université Abou Bekr Belkaid.*

*Je tiens à remercier, Monsieur le Promoteur, DRISSI M., maitre de conférences à l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien.*

*Mes remerciements s'adressent également à*

*Mr MOUSSA BOUDJEMAA B., Professeur à l'Université de Tlemcen qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury ., je l'en remercie profondément.*

*Mme HASSAINE H., Maitre de Conférences de Classe A à l'Université de Tlemcen, je la remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mr ABDELOUAHID D.E., Professeur à l'Université de Tlemcen m'a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner ce travail.*

*Mme BOUCHERIT Z., de m'avoir accueilli au niveau de son laboratoire.*

*Je tiens à remercier aussi*

*Mr BELLAHCEN M., Professeur à l'Université de Mostaganem pour son aide et ses conseils.*

*Tous les personnels des services de réanimation, ORL, neurochirurgie et chirurgie.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*

# *Sommaire*

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>.....</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>.....</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>.....</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I. Les antibiotiques.....</b>	<b>2</b>
1. Les $\beta$ -lactamines.....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Classification des $\beta$ -lactamines.....	2
1.2.1. Pénames .....	2
1.2.2. Céphèmes .....	2
1.2.3. Carbapénèmes .....	4
1.2.4. Monobactames .....	4
1.2.5. Inhibiteurs des $\beta$ -lactamases .....	4
1.3. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines .....	5
1.3.1 Pénétration des $\beta$ -lactamines dans les bactéries .....	5
1.3.2 Cible des $\beta$ -lactamine : protéines liant les pénicillines (PLP).....	6
2. Les aminosides .....	6
2.1. Définition.....	6

2.2. Classification des aminosides .....	6
2.3. Mécanisme d'action des aminosides.....	6
3. Quinolones.....	7
3.1. Définition.....	7
3.2. Classification des quinolones.....	7
3.3. Mécanisme d'action des quinolones .....	8
4. $\beta$ -lactamases .....	8
4.1. Classification des $\beta$ -lactamases .....	9
<b>Chapitre II. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....</b>	<b>11</b>
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
1.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.1.1. Résistance naturelle.....	12
1.1.2. Résistance acquise.....	13
1.1.2.1. Résistance enzymatique .....	13
1.1.2.2. Résistance non enzymatique .....	15
1.2. Résistance aux fluoroquinolones .....	16
1.3. Résistance aux aminosides.....	17
2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	17
2.1. Mécanisme de résistance aux $\beta$ -lactamines chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	18
2.1.1. Résistance naturelle.....	18
2.1.2. Résistance acquise.....	18
2.1.2.1 Résistance enzymatique .....	18

2.1.2.2. Résistance non enzymatique .....	19
2.2. Résistance aux aminosides .....	20
3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	20
3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	21
3.2. Résistance aux aminosides .....	22
3.3. Résistance aux fluoroquinolones .....	22
4. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	22
4.1 Résistance aux antibiotiques .....	23
5. <i>Ochrobacterum anthropi</i> .....	23
5.1. Résistance aux antibiotiques .....	24

## **Partie II : MATERIEL ET METHODES**

1. Matériel.....	25
1.1. Matériel biologiques.....	25
1.1.1. Souches étudiées .....	25
1.1.2. Souches de références et plasmides utilisés .....	25
1.2. Milieux de culture .....	25
1.3. Tests biochimiques .....	25
1.4. Antibiotiques .....	26
1.4.1. En disque .....	26
1.4.2. En poudre .....	26
2. Méthode.....	26

2.1. Prélèvements .....	26
2.2. Isolement et purification .....	26
2.3. Identification .....	26
2.4. Test d'oxydase.....	27
2.5. Antibiogramme.....	27
2.6. Détermination des CMI en milieu solide.....	29
2.7. Test à la cloxacilline.....	30
2.8. Test de synergie.....	30
2. 9. Test de Hodge.....	31
2. 10. Test IMP-EDTA.....	31
2.11. Extraction de l'ADN plasmidique .....	32
2. 12. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	33

### **Partie III : RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Résultats .....	35
1.1. Prélèvements .....	35
1.2. Souches étudiées .....	35
1.3. Etude de la résistance aux antibiotiques d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
1.4. Détermination des niveaux de CMI .....	39
1.5. Test à la cloxacilline.....	40
1.6. Test de synergie.....	41
1.7. Recherche d'enzymes ayant une activité cabapénèmases .....	41
1.8. Plasmides : visualisation sur gel d'agarose .....	43

1. 9. Résistance aux antibiotiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
1. 10. Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
2. Discussion.....	46
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>63</b>



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Diversité des antibiotiques de type beta-lactames : principaux cycles et antibiotiques représentatifs.....	5
<b>Figure 2.</b> Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame .....	9
<b>Figure 3.</b> Régulation du gène ampC.....	14
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique de la pompe MexAB-OprM. CM et OM indique les membranes cytoplasmique et extérieure respectivement .....	16
<b>Figure 5.</b> Sites de modification d'aminoside par les enzymes: AAC, ANT et APH .....	20
<b>Figure 6.</b> Schéma de Vedel.....	28
<b>Figure 7.</b> Répartition des bactéries non fermentants et des entérobactéries isolées à partir de divers prélèvements .....	36
<b>Figure 8.</b> Répartition d' <i>A. baumannii</i> et <i>P. aeruginosa</i> à partir des prélèvements de patients .....	36
<b>Figure 9.</b> Répartition de <i>P. aeruginosa</i> et <i>A. baumannii</i> à partir prélèvements de l'environnement .....	37
<b>Figure 10.</b> Répartition des souches selon les prélèvements .....	38
<b>Figure 11.</b> Taux de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	38
<b>Figure 12.</b> Résultat du test à la cloxacilline.....	41
<b>Figure 13.</b> Résultat de test de Hodge.....	42
<b>Figure 14.</b> Résultat du test à EDTA .....	42
<b>Figure 15.</b> Visualisation des plasmides sur gel d'agarose.....	43
<b>Figure 16.</b> Taux de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44

**Figure 17.** Répartition des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de  
*Pseudomonas aeruginosa*.....45

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification des $\beta$ -lactamases bactériennes (Bush et al, 1995).....	10
<b>Tableau 2.</b> Valeurs des CMI des $\beta$ -lactamines ( $\mu\text{g}/\text{m}$ ).....	39
<b>Tableau 3.</b> Valeurs des CMI des aminosides et des fluoroquinolones ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	40
<b>Tableau 4.</b> Phénotypes de résistance observés chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45

# ***INTRODUCTION***

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentants occupent une place très importante parmi les germes responsables d'infections nosocomiales. Ces bactéries ont un niveau de résistance naturel élevé, en relation avec différents mécanismes de résistance : sécrétion d'enzymes, imperméabilité membranaire, efflux. Elles peuvent acquérir des résistances (**Lepape, 2007**) qui peuvent être le fait d'une mutation chromosomique ou de l'acquisition de plasmides de résistance. Alors que la résistance par mutation chromosomique ne se transmet pas horizontalement, la résistance par acquisition de plasmides de résistance peut être transmise d'une bactérie à une autre, d'où son caractère épidémique.

La détection de cette résistance permet de prévenir et de ralentir la diffusion de souches mutirésistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie.

Ainsi cette étude a été menée au niveau de CHU de Tlemcen, dans le but d'évaluer des niveaux de résistance aux antibiotiques les plus communément utilisés :  $\beta$ -lactamines, aminosides et fluoroquinolones.

***PARTIE I***  
***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

## **Chapitre I. Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible. Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (Avril et al., 2002).

### **1. les $\beta$ -Lactamines :**

#### **1.1. Définition :**

Les bêtalactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle bêtalactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations (Cavallo, 2004).

#### **1.2. Classification des $\beta$ -Lactamines :**

##### **1.2.1. Pénames :**

Pénicilline G, pénicillines M, pénicilline A, pénicilline V, carboxy-pénicilline et uréido-pénicillines (Caillon, 2007).

##### **1.2.2. Céphèmes :**

- ✓ Céphamycines : Les principales molécules sont la céfoxitine et le céfotétan qui sont rattachées, du fait de leurs propriétés, aux céphalosporines de deuxième génération. Elles sont caractérisées par un radical  $\alpha$ -méthoxy en

position 7. Ce radical protège le noyau b-lactame de l'hydrolyse par les b-lactamases, mais est responsable d'un effet inducteur intense sur les céphalosporinases chromosomiques (**Cavallo et al., 2004**).

✓ Oxa -1-céphèmes : latamoxef (**Laurent, 2009**).

✓ Céphalosporines :

Les céphalosporines ont pour noyau commun l'acide 7 amino céphalosporinique. Leur classification repose sur leur spectre d'activité de plus en plus large que sur leur structure chimique commune (**Toure, 2004**).

▪ Céphalosporines de première génération :

Il existait plus d'une dizaine céphalosporines dites de première génération mais certaines ne sont plus commercialisées. Exemple : Céfaclor, Céfadroxil, Céfalexine, Céfalotine, Céfatrizine, Céfazoline, Céfradine.

▪ Céphalosporines de deuxième génération :

Les céphalosporines de deuxième génération comprennent la céfuroxime, le céfamandole et la céfoxitine. Elles sont caractérisées par une meilleure résistance aux  $\beta$ -lactamases et un spectre d'action plus large, une activité à faible concentration, une bonne diffusion tissulaire (**Allain, 2008**).

▪ Céphalosporines de troisième génération :

Exemple : Céfotaxime - ceftazidime – ceftriaxone – céfopérazone (**Toure, 2004**).

▪ Céphalosporines de quatrième génération :

Restent actives chez les enterobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase, inactives en cas de bétalactamases à spectre étendu.

Exemple : Cefepime, Cefpirome (**Hincky, 2008**).



### **1.2.3. Carbapénèmes :**

Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines qui présentent un très large spectre d'activité et une grande stabilité vis-à-vis de la plupart des  $\beta$ -lactamases. L'imipénème et le méropénème ont été les deux premiers représentants disponibles en clinique. Une troisième molécule s'est ajoutée, l'ertapénème (**Zhanel et al., 2005**).

Parmi les nouvelles carbapénèmes, le doripénème garde une meilleure activité sur les bacilles à Gram négatif et particulièrement sur les aérobies stricts (**Zahar et al., 2010**).

### **1.2.4. Monobactames :**

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle  $\beta$ -lactame. Exemple : Aztreonam (Cavallo, 2004).

### **1.2.5. Inhibiteurs des $\beta$ -lactamases :**

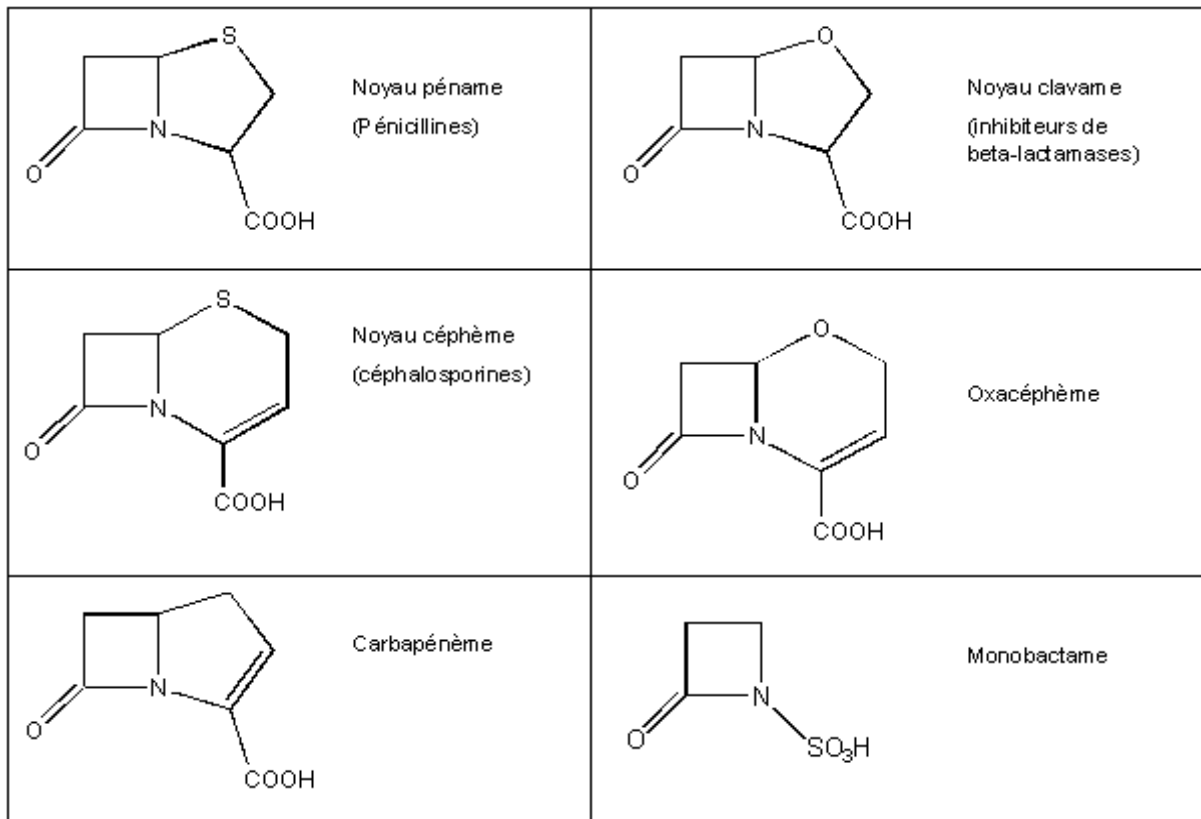
Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases possèdent une faible activité antibactérienne intrinsèque. En se liant à la bêtalactamase, ils permettent l'activité de la bêtalactamine à laquelle ils sont associés. Il en résulte une action synergique et une augmentation de l'activité de la bêtalactamine.

Actuellement, sont disponibles l'association

- amoxicilline-acide clavulanique (Augmentin) (**Andre et al., 1998**).
- pipéracilline-tazobactam (Tazocillin)
- Sulbactam : En plus de son effet inhibiteur irréversible sur les  $\beta$ lactamases,

le sulbactam a une activité antibiotique intrinsèque sur quelques germes, mais il est toujours utilisé en association avec les antibiotiques détruits par les  $\beta$ -lactamases.

-Sulbactam+ampicilline estérifiée : Unacim\* (**Allain, 2008**).



**Figure 1.** Diversité des antibiotiques de type beta-lactames : principaux cycles et antibiotiques représentatifs (Tulkens et al., 2002).

### 1.3. Mécanisme d'action des $\beta$ -Lactamines :

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes de glycanes reliées par des peptides. Ses précurseurs sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (Perronne, 1999).

#### 1.3.1. Pénétration des $\beta$ -lactamines dans les bactéries:

Les  $\beta$ -lactamines sont des acides relativement forts et franchissent parfois difficilement les membranes bactériennes.

Pour les bactéries à Gram négatif il existe une « membrane externe », située à l'extérieur du peptidoglycane et la pénétration est conditionnée par des

protéines « les porines » dont l'assemblage délimite les pores ou point de pénétration (**Moulin et al., 2002**).

### 1.3.2. Cible des $\beta$ -lactamine : protéines liant les pénicillines (PLP)

Les  $\beta$ -lactamines se fixent sur les PLP à la place du dipeptide d'alaline avec lequel elles présentent une analogie structurale. Cette fixation bloque la synthèse du peptidoglycane et de ce fait la croissance bactérienne. La bactéricide est obtenue avec l'activation du système enzymatique de la muréine hydrolase qui provoque l'éclatement de la bactérie.

$\beta$ -lactamines  $\longrightarrow$  arrêt de synthèse du peptidoglycane + activation de l'autolyse  $\longrightarrow$  Effet létale (Pourriat et al., 2005).

## 2. Les aminosides

### 2.1. Définition :

Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un **aminocyclitol** (cycle à 6 chaînons avec des groupements amines), auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 (ou exceptionnellement 3 dans la néomycine) **hexoses** (**Tulkens et al., 2002**).

### 2.2. Classification des aminosides:

Ils sont divisés en trois classes :

1 - Les déoxystreptamines bisubstituées 4-5 qui comprennent: Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine.

2 - Les déoxystreptamines bisubstituées 4-6 qui comprennent: Kanamycines A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibécacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine.

3 - Les autres : Streptomycine, Streptidine, Spectinomycine (**Ezaitouni et al., 1999**).

### 2.3. Mécanisme d'action des aminosides:

Les aminosides agissent au niveau du ribosome bactérien et perturbent la synthèse protéique (**Eric, 2008**).

La pénétration des aminosides à l'intérieur de la bactérie se fait en 3 étapes :

- La première étape est un passage passif permet la traversée de la membrane externe (pour les Gram -) via les porines, puis la traversée du peptidoglycane (Gram + et -). Les aminosides se concentrent alors au niveau de la membrane cytoplasmique (**Changeur et al., 2009**).
- La deuxième étape requiert une énergie métabolique délivrée par un gradient entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et cette étape peut être bloquée par mutation. Elle peut également être perturbée, si les conditions strictes exigées par la production d'énergie oxydatif pour le transport des aminosides ne sont pas respectées. Ceci explique la sensibilité réduite des anaérobies aux aminosides, et la diminution d'activité des aminosides sur les anaérobies facultatifs (entérobactérie) en cas d'infection en anaérobiose relative (foyer profond) (**Bryskier, 1999**).
- La troisième et dernière étape est rapide, Les aminosides se fixent sur le ribosome et provoquent la fixation d'un ARNt incorrect sur l'ARNm, ce qui perturbe la reconnaissance codon-anticodon et induit la synthèse de protéines erronées.

Un effet supplémentaire induit par l'incorporation de protéines anormales est l'altération de la membrane cytoplasmique. Cela se traduit par une action bactéricide rapide et puissante (**Marty, 2000**).

### **3. Les quinolones :**

#### **3.1. Définition :**

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique, qui dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués. Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones, ainsi appelées car contenant un atome de fluor en position 6, dérivent de la quinoléine (**Thomas, 2001**).

### 3.2. Classification des quinolones:

- Quinolones de première génération (a. nalidixique)
- Quinolones de deuxième génération (ofloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine, ...)
- Quinolones de troisième génération (trovafloxacine, gémifloxacine, moxifloxacine)
- Quinolones de quatrième génération : des fluoroquinolones (garénoxacine) **(Lafaurie, 2008).**

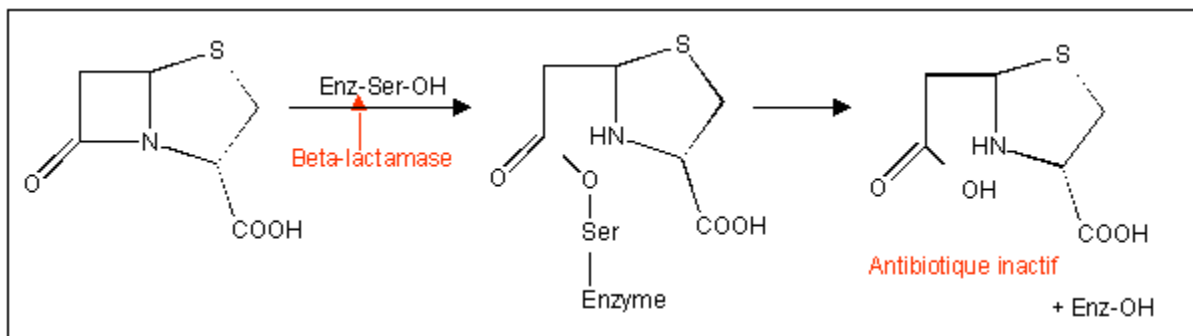
### 3.3. Mécanisme d'action des quinolones :

Le mécanisme d'action de cette classe pharmacologique consiste en une inhibition de l'ADN gyrase, topoisomérase II bactérienne composée de deux sous-unités A et deux sous-unités B et de la topoisomérase IV. Ces enzymes sont essentielles à la réplication et à la transcription de l'ADN bactérien; l'inhibition par les quinolones du complexe ADN bactérien - enzymes empêche le «surenroulement» de l'ADN, le relâchement de l'ADN «surenroulé» et entraîne la séparation de la double chaîne hélicoïdale de l'ADN. Les quinolones sont spécifiques à l'ADN bactérien et exercent une activité bactéricide pendant la phase de multiplication et de repos des bactéries **(Larouche, 2001).**

### 4. $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif

( **Philippon et al ., 2006**) hydrolysant le pont amide du cycle b-lactame pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif **(Barrial et al., 2006).**



**Figure2.** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle b-lactame

(Barrial et al., 2006)

#### 4.1. Classification des $\beta$ -lactamases :

Actuellement deux classifications s'imposent

##### ✓ Classification structurale de Ambler

Proposée en 1980, cette première classification dite structurale, est basée sur la structure primaire de l'enzyme, notamment du le site actif. Elle individualise quatre classes moléculaires A, C et D (appelées sérines enzyme) et B (dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif).

-la classe A correspond aux pénicillinases et aux  $\beta$ -lactamases chromosomiques ou plasmidiques sensibles à l'acide clavulanique.

-la classe B comprend les métalloenzymes, inhibés par l'EDTA.

- la classe C inclut les céphalosporinase résistantes à l'acide clavulanique habituellement chromosomiques.

- la classe D regroupe les Oxacillinases (Jacob, 2003).

##### ✓ Classification fonctionnelle de Bosh-Jacoby-Medeiros

La classification fonctionnelle réactualisée en 1995 et proposée par Bosh et al, est basée sur le spectre préférentiel des enzymes et sur leur comportement aux inhibiteurs (Jacob, 2003).

**Tableau 1. Classification des  $\beta$ -lactamases bactériennes (Bush et al, 1995)**

Bush-Jacoby-Meideros group	1989 Bush group	Richmond-Sykes class	Mitsuhashi-Inoue type	Molecular class (Ambler)	Preferred substrates	Inhibited by CA EDTA	Representative enzymes
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Céphalosporins	- -	AmpC enzymes from Gram negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+ -	Penicillinases from Gram positive Bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+ -	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended spectrum cephalosporins, monobactams	+ -	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	+/- -	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+ -	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	+/- -	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+ -	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, Carbapenems	+ -	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most b-lactams, including carbapenems	- +	L1 from <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA from <i>Bacteroides Fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND	Penicillins	- ?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

CSase, cephalosporinase ; PCase, penicillinase ; CXase, cefuroxime-hydrolasing betalactamase.

CA, clavulanic acid; ND, not determine.

## Chapitre II. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNnF) sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Outre la famille des *Pseudomonadaceae*, les BGNnF comportent aussi *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium* et *Sphingobacterium*. Au sein des *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales (**Berthelot et al., 2005**).

Ces bactéries, cultivent sur milieux ordinaires et possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminale d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose (**Denis et al., 2007**).

### 1. *Pseudomonas aeruginosa* :

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram-négatif opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (**Sabin, 2006**).

Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires) (**Euzéby, 2005**).

*P. aeruginosa* possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. Elle est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (**Potvin, 2007**).



Comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (**Khalilzadeh, 2009**). On peut noter également la production d'un voile fragile visqueux et peu épais à la surface des milieux liquides avec une odeur aromatique caractéristique (odeur de seringa). *P. aeruginosa* est capable de produire de nombreuses exoprotéines aux fonctions diverses : l'entérotoxine A, l'exotoxine A, l'exoenzyme S, la phospholipase (enzyme hydrolisant la lécithine), les protéases (**Jean, 2004**). *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson sont spécialement destinés à mettre cette propriété en évidence. Comme la plupart des *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* possède une oxydase. D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce : Indole -, urée -, TDA - (tryptophane-désaminase), H<sub>2</sub>S -, gélatine +, ONPG - (orthonitrophényl-galactose), Nitrate-réductase +, LDC -, (Lysine-décarboxylase), ODC - (Ornithine-décarboxylase), ADH + (Arginine-deshydrogénase) (**Lie, 2002**). *P. aeruginosa* est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (**Rossignol, 2007**).

### **1.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa***

Le développement de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* a été associé à la production de  $\beta$ -lactamases acquises, la surproduction constitutive de la céphalosporinase AmpC ou mécanismes non enzymatiques tels que l'efflux ou l'imperméabilité de la membrane externe (**Cavallo et al., 2002**).

#### **1.1.1. Résistance naturelle**

*P. aeruginosa* possède une membrane externe faiblement perméable, ce qui lui confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, dont la plupart des

bêtalactamines hydrophiles (**Carpentier et al., 2003**), la bactérie produit d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération (**Sougakoff et al., 2003**), et en fin l'existence des systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. La pompe la plus fréquemment rencontrée chez *Pseudomonas aeruginosa* est de type MexAB-OPrM (**Cattoir, 2004**).

*Pseudomonas aeruginosa* est donc naturellement résistante aux aminopénicillines, benzylpénicilline, C1G, C2G, et certains C3G comme le Céfotaxime et le moxalactam (**Vedel, 2005**), *P. aeruginosa* est naturellement sensible aux carboxypénicillines, comme la ticarcilline et la carbénicilline, aux uréidopénicillines, comme la pipéracilline, à certaines céphalosporines (cefsulodine, céfoperazone et ceftazidime), aux monobactames, comme l'aztréonam, et aux carbapénèmes, comme l'imipénème et le méropénème (**Poirel, 2006**).

### **1.1.2. Résistance acquise**

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Dans ce cas, la résistance acquise est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (**Faure, 2009**).

#### **1.1.2.1. Résistance enzymatique**

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type sérine (classes A, C et D) ou métalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des  $\beta$ -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (**Philippon, 2005**).

### ✓ Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C

La  $\beta$ -lactamase chromosomique de type AmpC a été décrite chez une large variété de bacilles à Gram négatifs tel que *P. aeruginosa* (Parveen et al., 2010). Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes (Poirel, 2006).

La régulation de l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC fait intervenir les gènes *ampR*, *ampD*, *ampG* (Gautier, 2007) Le gène *ampR* correspond notamment à un activateur transcriptionnel du gène *ampC* qui est inductible en présence de  $\beta$ -lactamines et qui est réprimé par la protéine codée par le gène *ampD* (Barrial, 2006).

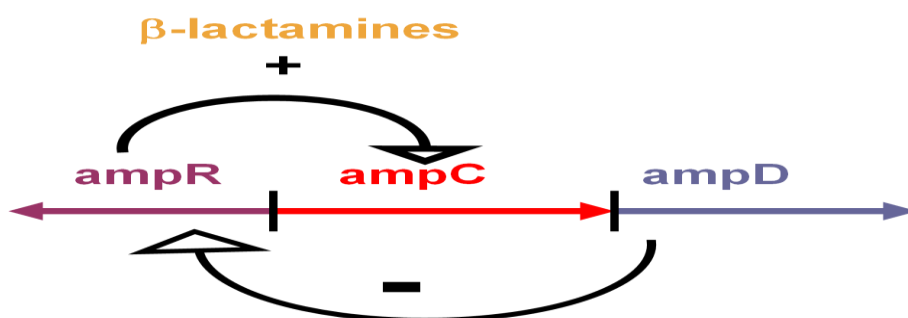


Figure 3 : Régulation du gène *ampC* (Barrial, 2006)

### ✓ Oxacillinace de classe D

Chez *P.aeruginosa* des BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées (OXA-10, 11, 14, 15, 16, 19) ainsi que la  $\beta$ -lactamase OXA-18. Ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18) (Pourriat et al., 2005). Ils hydrolysent la plus part des  $\beta$ -lactamines y compris les céphalosporines, l'imipénème et le méropénème. L'aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Pechère et al., 2008). L'OXA-18 est la seule  $\beta$ -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifiée chez *P.aeruginosa*, *bla*<sub>OXA-18</sub> est localisé au niveau de chromosome (Naas et al., 1999).

### ✓ Carbapénèmases de classe B

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2, peut être maintenant en relation avec la synthèse de  $\beta$ -lactamases de type carbapénémase (classe B). Ce sont des métallo-enzymes (MBL) qui sont dépendantes de la présence d'ions  $Zn^{++}$ , donc inhibables par des chélateurs d'ions tel l'EDTA (**Philippon et al., 2006**).

### ✓ $\beta$ -lactamase à spectre étendu ou élargi

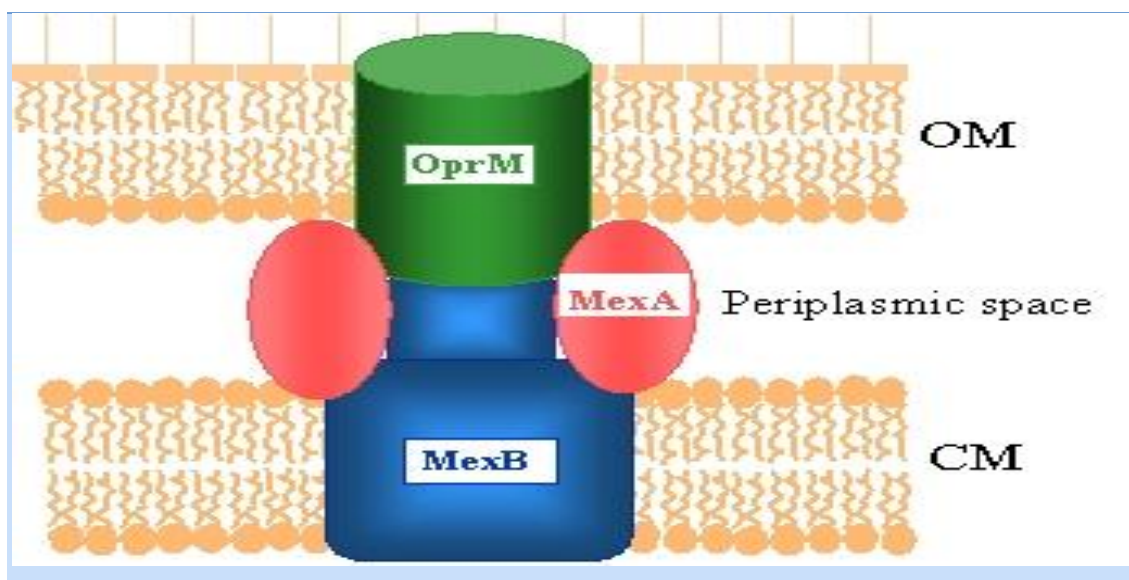
Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes récemment apparues à la suite de mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques (**Emmanuel, 2004**). Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (**Vora et al., 2010**).

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P.aeruginosa*. Il existe actuellement neuf types connus de BLSE GES, jusqu'à présent quatre de ces types de GES (GES-1, -2, -8 et -9) ont été trouvés dans *P.aeruginosa* (**Wang et al., 2006**). Il nous faut bien distinguer les résistances acquises aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (C3G), soit par hyperproduction de céphalosporinase, soit par BLSE car les phénotypes de résistance sont différents. Ces enzymes sont habituellement détectées par une synergie entre une C3G (notamment la ceftazidime) ou l'aztréonam et l'acide clavulanique (aspect en "bouchon de champagne" sur un antibiogramme) (**Emile, 2008**).

### 1.1.2.2. Résistance non enzymatique

#### ✓ Surexpression de système d'efflux

Le système MexAB-OprM, produit constitutivement, cause une résistance naturelle à la plupart des  $\beta$ -lactamines; par dépression génétique, il occasionne une résistance acquise à ces molécules. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais, suite à des mutations, peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent (Pechère et al., 1998).



**Figure 4.** Représentation schématique de la pompe MexAB-OprM. CM et OM indique les membranes cytoplasmique et extérieure respectivement (Barrant et al., 2009)

#### ✓ Perte de la porine OprD2

Dans les bactéries à Gram négatif, les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones (Pagès, 2004). Cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de liaison aux carbapénèmes, et permet la pénétration sélective de l'imipénème (Lahlou et al., 2008). Des modifications de la quantité absolue ou de l'état fonctionnel de ces porines ont pour conséquence une diminution de la diffusion des antibiotiques empruntant cette voie de pénétration. Ce mécanisme par

diminution de perméabilité peut entraîner une résistance croisée à plusieurs familles d'antibiotiques (Van et al., 1994).

Chez *P. aeruginosa*, la modification de la protéine de membrane externe OprD reste le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème (Barbier et al., 2010).

### 1.2. Résistance aux fluoroquinolones

Chez *P. aeruginosa*, la résistance de haut niveau est principalement liée à des mutations au niveau de *gyrA*. Cependant, chez cette espèce, les systèmes d'efflux actif MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN jouent un rôle important dans la résistance intrinsèque aux fluoroquinolones (Mérens et al., 2010).

### 1.3. Résistance aux aminosides

*Pseudomonas aeruginosa* contient des enzymes de modification des aminoglycosides AAC (6'), APH (2'), APH (3')-VI et AAC (3')-II (Kettner et al., 1995). Considérant que, chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (Sohidul, 2008).

## 2. *Acinetobacter baumannii* :

Bergey's manual de bactériologie systématique a classé le genre *Acinetobacter* dans la famille de *Neisseriaceae* mais cette disposition a jamais été formellement approuvée par les taxonomistes. Après cela les développements taxonomiques sont aboutis à la proposition que les membres du genre doivent être classés dans la nouvelle famille *Moraxellaceae* (Islam, 2009). Il y'a en fait 32 espèces génomiques, dont 17 Avec un nom validé. Seulement 10 espèces ont été isolées dans des échantillons humains

(*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *schindleri* A. et *A. ursingii*), et 7 espèces nouvellement décrites ont été isolées de boues activées (*A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. tandoii*, *tjernbergiae* A. et *A. townneri*) (Dortet, 2006).

*Acinetobacter baumannii* est considérée comme une bactérie ubiquiste ayant pour principal habitat le sol, les eaux, les végétaux, et des animaux (Euzéby, 2003). Chez

l'homme, elle peut coloniser la peau, les plaies et les tractus aériens et digestifs, elle peut résister la dessiccation pendant plusieurs semaines (**Marrakchi, 2008**). L'espèce est un cocobacille à Gram négatif, généralement regroupé en deux ou en chainettes de longueur variable, ne fermente pas le glucose, immobile, catalase positif et oxydase négatif (**Van et al., 2004**).

*Acinetobacter baumannii* est responsable de 5 à 10 % des infections nosocomiales dans des services accueillant des patients fragilisés, notamment les services de soins intensifs et de réanimation. On observe surtout des infections pulmonaires chez des patients sous ventilation assistée, des infections urinaires sur sonde et des infections liées aux cathéters avec le risque de septicémie.

Les individus en bonne santé ne sont généralement pas infectés (**Laure et al., 2004**).

## **2.1. Mécanisme de résistance aux $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii***

### **2.1.1. Résistance naturelle**

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* produisent une beta-lactamase chromosomique de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de première génération mais n'a pas d'activité pour les pénicillines et la pipéracilline (**Sougakoff et al., 2003**).

### **2.1.2. Résistance acquise**

#### **2.1.2.1. Résistance enzymatiques**

##### **✓ Céphalosporinase de classe C**

Différents mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii* (**Corvec et al., 2003**) liés principalement à la production de  $\beta$ -lactamases. *Acinetobacter baumannii* produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céphalotine) ou des carbapénems. L'insertion d'une séquence spécifique ISAbal en amont du gène bla<sub>ampC</sub> favorise l'expression de cette  $\beta$ -lactamase de type AmpC en fournissant des séquences promoteur ce qui entraîne la résistance à la Ceftazidime (**Nordmann et al., 2009**).

### ✓ Oxacillinase de classe D

Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méthicilline, cloxacilline et la benzylpénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl (Héritier et al., 2008). ), De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des  $\beta$ -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV (Cattoir, 2008).

*A. baumannii* produit une bêta-lactamase de classe D qui est l'oxacillinase représentée par le cluster d'enzyme OXA-51/OXA-69(Gerischer, 2008), les  $\beta$ -lactamases de type OXA-51/69 pourrait contribuer à la résistance aux carbapénems par l'insertion d'IS Aba1 dans la région promotrice du gène bla OXA-51/69(Poirel et al., 2009).

Des oxacillinases aux propriétés de carbapénémases sont identifiées chez *A. baumannii*, ces oxacillinases sont de trois grands types : OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression (Héritier et al., 2009).

### ✓ Métallo- $\beta$ -lactamases de classe B

Les  $\beta$ -lactamases de classe B ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les  $\beta$ -lactamines (Clavilier et al., 2001) elles sont inhibées par l'EDTA (Ruppé, 2010).

Trois groupes ont été identifiés chez *A. baumannii* (IMP-like, VIM-like et SIM-1) (L.Poirel et P. Nordmann, 2006), cette classe d'enzyme hydrolyse tous les  $\beta$ -lactamines à l'exception des monobactames (Conly et al., 2011).

### ✓ $\beta$ -actamases à spectre élargi

Chez *A. baumannii* les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques (Sinha et al., 2007) Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *A. baumannii*, Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam (Rodriguez-Villalobos et al., 2006). Les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégron comme gènes cassettes (VEB-1, IBC-1, GES-1, GES-3) et donc sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase (Philippon et al., 2006).



### 2.1.2.2. Résistance non enzymatiques

#### ✓ Surexpression du système d'efflux

Les pompes à efflux illustrent un phénomène unique dans la résistance aux médicaments: un seul mécanisme provoquant la résistance contre les différentes classes d'antibiotiques. *A. baumannii* possède une pompe à efflux AdeABC dont les substrats sont : Aminoglycosides, les tétracyclines, l'érythromycine, au chloramphénicol, triméthoprime, fluoroquinolones, des bêta-lactamines, et encore récemment, la tigécycline (**Wieczorek et al., 2008**).

#### ✓ Modification de l'expression des PLP

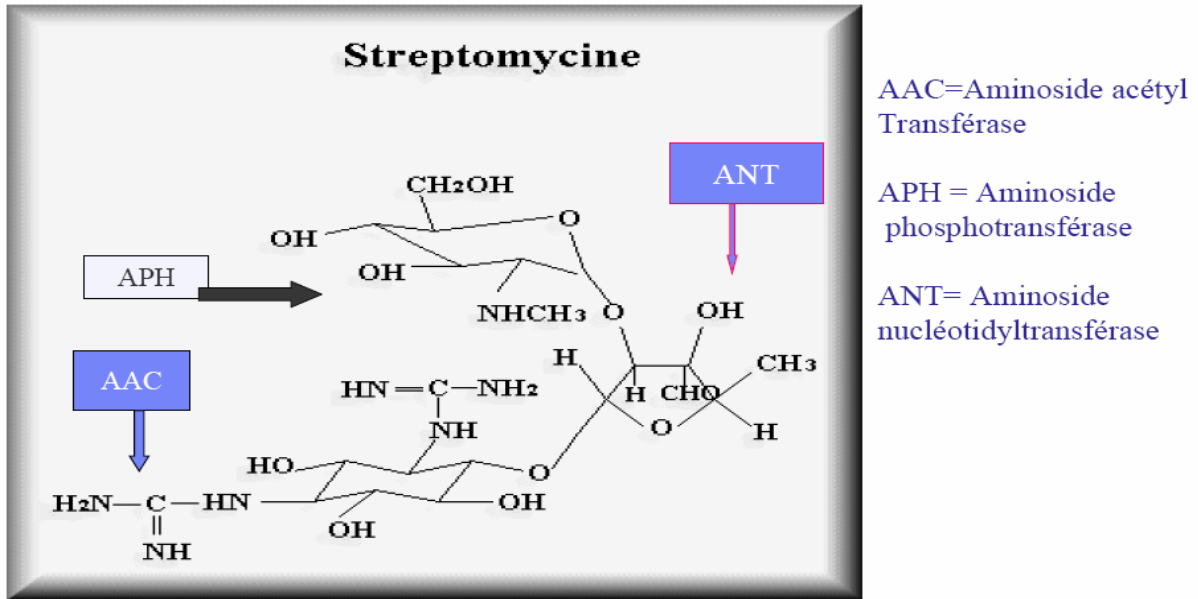
L'efficacité des bêta-lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison antibiotique / cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique (**Toure, 2004**).

### 2.2. Résistance aux aminosides

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certains enzymes de modification (**Moniri et al., 2010**), on a décrit depuis 1988 la production d'enzymes : APH (3')-I, APH (6), AAC (3)-I, ANT (2'')-I et APH (3')-IV (**Bergogne-Bérézin et al., 1999**).

*A.baumannii* possède une pompe à efflux de type Ade ABC qui confère la résistance à divers classes d'antibiotiques y compris les aminosides, elle est composée de protéines AdeA, AdeB et AdeC (**Marchand et al., 2004**).

Sites de modification d'aminosides par les enzymes: AAC ,  
ANT et APH



**Figure 5.** Sites de modification d'aminoside par les enzymes : AAC, ANT et APH  
(Saïdani, 2008)

### 3. *Stenotrophomonas maltophilia*

Précédemment connu sous le nom *Xanthomonas maltophilia*, est un bacille à Gram négatif aérobies. Il est lié au groupe de bactéries *Pseudomonas*. L'organisme a été isolé de l'eau, du sol, de sources animales, matières végétales, les aliments, les produits pharmaceutiques, les équipements hospitaliers et les humains. *Stenotrophomonas maltophilia* est habituellement un organisme non-pathogène et peut faire partie de la flore transitoire des patients hospitalisés (Alfred, 2007). Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* rassemblent des bacilles à Gram négatif, d'environ 0,5 µm de diamètre sur 1,5 µm de longueur, non sporulés, mobiles grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires, possédant des fimbriaes. (Euzéby, 2005)

Dans la culture les colonies sont lisses, brillantes avec des bords entiers et sont de couleur blanche à jaune pale. Cette bactérie est un aérobie strict qui se développe à des températures entre 5 et 40°C et un optimale de 35°C (Echemendia et al., 2010).

*S.maltophilia* est catalase positive et oxydase négative, elle a une réaction spécifique positive pour DNase extracellulaire (Mohammed Darwish, 2009).

*S.maltophilia* est une bactérie ubiquitaire qui colonise le plus souvent les patients par voie exogène. Cette espèce sous l'effet de la pression de sélection des antibiotiques est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Elle est responsable de septicémies, d'infections pulmonaires et d'infections urinaires (Denis et al, 2007).

### 3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

#### ✓ Production de $\beta$ -lactamases

Résistance naturelle à la plupart des bêta-lactamines, sauf le moxolactame, par production d'une métallo-bêta-lactamase (L1) de classe B et d'une bêta-lactamase à sérine active (L2) de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier le céfotaxime. La bêta-lactamase L2 est inductible et inhibée par l'acide clavulanique, ce qui explique la sensibilité de *S. maltophilia* à l'association ticarcilline-acide clavulanique (Sougakoff et al., 2003).

#### ✓ Système d'efflux

Plusieurs systèmes d'efflux ont été identifiés dans *S. maltophilia*, y compris SmeABC et SmeDEF. SmeABC ne semble pas contribuer à la résistance intrinsèque à *S. maltophilia* (Li et al., 2001), smeDEF confère une résistance aux antibiotiques appartenant à différentes familles structurales

### 3.2. Résistance aux aminosides

La résistance de *S. maltophilia* aux aminosides est traditionnellement attribuée soit à l'imperméabilité des bactéries, soit à l'export de l'antibiotique par les cellules, soit à la production d'une 6'-N-aminoside acétyltransférase. Le gène responsable, aac(6)-Iz, a été localisé dans le chromosome ( Courvalin, 2000).

### 3.3. Résistance aux fluoroquinolones

Une résistance acquise à ces fluoroquinolones liée à des modifications de la membrane externe et supportée par le chromosome. Un système d'efflux actif lié à une protéine

de la membrane externe (OMP54) est responsable de la multirésistance cryptique (MDR) (Eyquem et al., 2000).

#### **4. *Burkholderia cepacia***

En 1950, William Burkholder, un microbiologiste américain, le premier qui a décrit ce microorganisme comme agent causal du rot bactérien des bulbes d'oignon au niveau du Cornell University. Jusqu'à 1992, la bactérie était classée comme *Pseudomonas cepacia*. En 1992 *P. cepacia* et d'autres six espèces appartenant au genre de *Pseudomonas* étaient transférées dans un nouveau genre : *Burkholderia* (Gautam et al., 2011). Un certain nombre de microorganismes ont été classés dans ce genre par exemple : *B. endropogonis*, *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. graminis*, *B. pyrrocinia*, *B. siamensis*, *B. thailandensis*, *B. vandii*, etc (Tong, 2001).

La bactérie occupe diverses niches écologiques, comme les sols, l'eau, les animaux, les plantes et les humains (Peter, 2009). *Burckolderia cepacia* est un bacille à Gram négatif qui est 1.06 à 3.02 µm de longueur, c'est un aérobie stricte et chimioorganotrophe, avec une température optimale de 30 à 35°C (Steenhoek, 2000). Il est rare que cette bactérie soit la cause d'infections chez les personnes en santé, mais elle peut toute fois entraîner des complications chez les personnes atteintes de fibrose kystique (FK), de même que chez les personnes dont l'organisme ne peut combattre efficacement (Speert, 2002).

##### **4.1. Résistance aux antibiotiques**

*B. cepacia* est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les carboxypénicillines, les aminosides et la colistine (Le Bourgeois et al., 2005). La pipéracilline, la ceftazidime, le méropénème (contrairement à l'imipénème), et la témocilline sont les molécules les plus actives (Segonds et al., 2006).

##### **✓ Système d'efflux**

*Burkholderia cepacia* présente un haut niveau de résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques (β-lactamines, aminosides, fluoroquinolones). Ceci est

partiellement dû à la présence de différentes pompes MDR comme SmeABC, CeoAB-OpcM, AmrAB-OprA ou BpeAB-OprB (Cattoir, 2004).

#### ✓ **Imperméabilité**

*Burkholderia cepacia* est le plus souvent multirésistant aux antibiotiques. Les mécanismes impliqués sont essentiellement l'imperméabilité (résistance naturelle aux antibiotiques polycationiques : aminoglycosides, polypeptides, dont le passage à travers la membrane externe nécessite la présence de récepteurs anioniques au niveau du LPS, récepteurs qui sont très peu nombreux chez *B. cepacia*, imperméabilité à l'imipénème) (Segonds et al., 2001).

#### ✓ **$\beta$ -lactamase de classe A (PenA)**

La résistance du complexe *B. cepacia* a été liée à une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible qui a été faussement identifiée comme une enzyme de type AmpC. Puis, Trépanier et al a décrit une  $\beta$ -lactamase de classe A (Pen A).

Pen A possède un profil à spectre étroit, et elle est régulée par un régulateur transcriptionnel de type Lyse R, PenR. Cette régulation négative est responsable de l'expression inductible de Pen A (Nordmann et al., 2009).

### **5. *Ochrobacterum anthropi***

Le genre *Ochrobactrum* a été proposé en 1988 par Holmes et collaborateurs, et la première espèce à avoir été décrite est *O. anthropi*. Le genre *Ochrobactrum* est aujourd'hui composé de 11 espèces : *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. tritici*, *O. grignonense*, *O. gallinifaecis*, *O. lupini*, *O. oryzae*, *O. cytisi*, *O. pseudintermedium*, *O. haematophilum* et *O. pseudogrignonense* (Bounaadja., 2010).

*O. anthropi* Gram négatif, aux extrémités arrondies, non sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, strictement aérobie, à métabolisme strictement respiratoire, oxydase et catalase positive, chimio-organotrophe, capable d'utiliser de nombreux acides aminés, sucres ou acides organiques comme unique source de carbone.

La croissance est optimale pour une température comprise entre 20 et 37 °C. Sur gélose nutritive, les colonies sont non pigmentées (Euzéby, 2008).

*O. anthropi* présente une capacité de coloniser une large variété d'habitats, à partir des environnements hostiles jusqu'à les plantes, nématodes, insectes, animaux et l'homme

(**Romano et al., 2009**). Généralement, la souche est considérée moins virulente, un nombre limité d'infections lié à l'homme du à *O. anthropi* est décrit chez les sujets immunodéprimés (**Rihova et al., 2009**) elle est impliquée dans la contamination de matériel médicale (**Arora et al., 2008**) et rarement dans la bactériémie chez les patients qui font l'hémodialyse (**Javaid et al., 2008**).

### **5.1. Résistance aux antibiotiques**

*O. anthropi* est résistante à la plus part des céphalosporines et des penicillines, cette résistance est due à l'expression d'une  $\beta$ -lactamase inductible de type AmpC qui hydrolyse principalement les céphalosporines, cet enzyme est résistant à l'acide clavulanique. L'expression du gène AmpC est inductible via un régulateur AmpR qui existe en amon (**Higgins, 2001**). *O. anthropi* est résistant à l'aztréonam, il est généralement sensible aux carbapénèmes, aux aminosides, au triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la ciprofloxacine, et aux les tétracyclines (**Nadjjar et al., 2001**).

***PARTIE II***  
***MATERIEL ET METHODES***

## **1. Matériel**

### **1.1. Matériel biologiques**

#### **1.1.1. Souches étudiées**

Ont été incluses dans l'étude des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* isolées à partir de divers prélèvements (aspiration trachéale, sonde urinaire, prélèvement rectal, plaie chirurgicale)

#### **1.1.2 Souches de références et plasmides utilisés**

- ✓ ATCC 27853
- ✓ *Escherichia coli* 25922
- ✓ VP 517

### **1.2 Milieux de culture**

#### **✓ liquide**

- Bouillon nutritif (BN) (Fluka)
- Bouillon cœur cerveau (BHIB) (Fluka)
- Eau physiologique

#### **✓ solide (Fluka)**

- Gélose nutritive
- Mac Conkey
- Mueller Hinton.

### **1.3 Tests biochimiques**

- Galerie API 20 NE (Bio Mérieux)
- Disques d'oxydase.



## **1.4 Antibiotiques**

### **1.4.1 En disque (Bio Rad)**

Ticarcilline (Tic), Ticarcilline/ Acide clavulanique (TCC), Imipénème (IPM), Aztréonam (ATM), Ceftazidime (CAZ), Céfépime (FEP), Céfopérazone (CFP), Gentamycine (GM), Tobramycine (TM), Amikacine (AN), Ciprofloxacine (CIP), colistine (CS).

### **1.4.2. En poudre**

Ticarcilline (Glaxo Smith Kline), Ticarcilline+ Acide clavulanique (Glaxo Smith Kline), Pipéracilline (Dakota<sup>R</sup> Pharm), Pipéracilline+Tazobactam (Wyeth Pharmaceuticals), Cloxacilline (Bristol-Mayers Squibb), Imipénème (MSD), Aztréonam (Sanofi-Synthelabo), Ceftazidim (Glaxo Smith Kline), Céfépime(Bristol-Mayers Squibb), Tobramycine (Merck), Amikacine (Merck), Gentamycine (Panpharma), Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

## **2. Méthodes**

### **2.1. Prélèvements**

Les différent prélèvements sont effectués (sondes ou écouvillons) sont mis dans un bouillon nutritif et acheminés au laboratoire pour être incubés à 37°C pendant 24 h.

### **2.2. Isolement et purification**

L'ensemencement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conckey à 37°C pendant 24 h. Elles sont ensuite purifiées après plusieurs passages sur le même milieu. La gélose nutritive additionnée au cétrimide est le milieu sélectif pour les bacilles pyocyaniques.

### **2.3. Identification**

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les

milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 1).

#### **2.4. Test d'oxydase (Guillaume, 2004)**

##### **✓ Principe**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

##### **✓ Technique**

Ce test est réalisé en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique.

##### **✓ Lecture**

Une réaction positive se traduit par une coloration violette en 2 minutes environ.

#### **2.5. Antibiogramme (CA-SFM, 2010)**

L'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé, méthode recommandée par le CA-SFM.

##### **✓ Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture de 18h, la suspension est calibrée pour avoir un inoculum de  $10^8$  UFC/ml, correspondant à une densité optique de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, soit une densité égale à 0,5 Mc Farland.

##### **✓ Ensemencement**

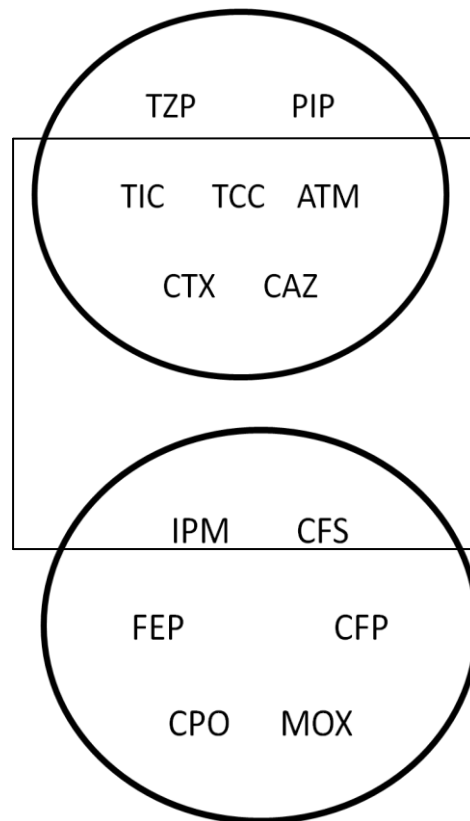
-La solution est diluée au 1/100 dans l'eau physiologique.

-La suspension diluée est ensemencée sur les boîtes de Muller-Hinton.

-L'excès est rejeté, et les boîtes sont mises à sécher à 37°C pendant 30 minutes.

✓ **Application des disques**

Les disques d'antibiotiques sont appliqués sur les boîtes. Pour les  $\beta$ -lactamines, l'application des disques suit le schéma de Vedel (**Figure 6**)



Principaux marqueurs	Marqueurs secondaires	Liste des complémentaires
TIC : Ticarcilline	TCC:Ticarcilline/ acide	TZP:Pipéracilline/Tazobactam
CTX : Céfotaxime	clavuianique	PIP: Pipéracilline
CAZ : Ceftazidime	ATM: Aztréonam	FEP: Céfépime
IMP: Imipéneme	CFS: Cefsulodine	CFP: Céfopérazone
		CPO: Cefpirome
		MOX: Moxalactam

**Figure 6. Schéma de Vedel (2005)**

### ✓ **Lecture**

Après 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés afin de déterminer les catégories cliniques selon les valeurs critiques.

### **2.6. Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 2010)**

La méthode de dilution en milieu solide est la méthode quantitative qui permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.

#### ✓ **Préparation des solutions d'antibiotiques**

Pour chacun des antibiotiques préparer une solution mère à 5120 mg /ml puis réaliser des dilutions sériées de progression géométrique.

#### ✓ **Préparation des boites**

-Distribuer 2ml de chaque dilution dans des boites.

-Ajouter 18 ml de Mueller-Hinton gélosé maintenu en surfusion à 45°C.

-Homogénéiser et laisser les boites se solidifier à la température du laboratoire.

-sécher les boites à 37°C pendant 30minutes à l'étuve.

#### ✓ **Préparation de l'inoculum**

Préparer des suspensions de densité de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester. La souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisé comme contrôle de la concentration des boites.

#### ✓ **Ensemencement**

-Diluer la suspension au 1/10.

-Ensemencer par spot 2µl, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

### ✓ **Lecture**

La lecture se fait après 24 heures d'incubation. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle la croissance est inhibée.

### **2.7. Test à la cloxacilline (Brasme et al., 2009)**

#### ✓ **Principe**

La cloxacilline est un antibiotique qui permet d'inhiber les  $\beta$ -lactamase de type AmpC.

#### ✓ **Technique**

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Müller-Hinton additionné de cloxacilline à 500  $\mu\text{g/ml}$  et à 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### ✓ **Lecture**

On observe une restauration de l'activité des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

### **2.8. Test de synergie (T. Naas, 2003)**

#### ✓ **Principe**

La démonstration phénotypique de la présence de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique.

#### ✓ **Technique**

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline à 500 $\mu\text{g/ml}$ , préalablement ensemencée par la souche à tester, un disque de ceftazidim (CAZ) et/ ou de céfépim (FEP) et un disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC), distant 1,5cm.

#### ✓ **Lecture**

- Si BLSE, la synergie est visible entre les disques FEP et/ou CAZ et TCC.

## **2. 9. Test de Hodge (Lee et al., 2003)**

### **✓ Principe**

Ce test permet la mise en évidence d'une enzyme hydrolysant l'imipénème chez une souche résistante à cet antibiotique à l'aide d'une souche sensible.

### **✓ Technique**

-Préparer une suspension d'*Escherichia coli* 25922 de 0.5 Mc Farland

-Diluer la suspension a 1/10 (par l'addition de 0.5 ml de la suspension de 0.5 Mc Farland dans 4.5 ml de MHB)

-Ensemencer par écouvillonnage une gélose Muller Hinton et laisser sécher

-Déposer un disque d'imipénème au centre

-Dans une ligne droite, ensemencer la souche à tester du bord de disque jusqu'au bord de la boîte

-Incuber à 35°C pendant 16 à 24 heures.

### **✓ Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* indicatrice.

## **2. 10. Test IMP-EDTA (Behera et al., 2008)**

### **✓ Principe**

Ce test permet de différencier les métallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L) des autres  $\beta$ -lactamases hydrolysant les carbapénèmes.

### **✓ Technique**

Elle consiste à déposer 5  $\mu$ l d'EDTA 0,5 M sur un disque blanc (papier filtre wathmann, diamètre 6mm), placé 10 à 25 mm centre à centre avec un disque d'imipénème.

### ✓ **Lecture**

Un résultat positif se traduit par une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui de l'EDTA.

## **2.11. Extraction de l'ADN plasmidique (Kado et Liu, 1981, modifiée)**

### ✓ **Principe**

La technique repose sur la lyse bactérienne par un traitement SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) alcalin combiné à la chaleur suivie d'une élimination des protéines, ADN chromosomique, et ARN de haut poids moléculaire par des solvants organiques.

### ✓ **Technique**

- Réaliser une culture bactérienne dans 5ml de LB et incubé 24 heures à 37°C
- Centrifuger 2 à 3 ml de la culture à 14000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante
- Jeter le surnageant et remettre en suspension le culot dans 100µl de solution contenant 0.04 M Tri-acetate, pH 8.0 et 0,02 M d'EDTA. Bien vortexer.
- Ajouter 200 µl de solution de lyse et mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Incuber à 55°C pendant une heure
- Ajouter à chaud 600µl à l'échantillon le phénol-chloroforme-isoamylalcool et mélanger doucement
- Séparer les phases par centrifugation à 14000 rpm pendant 15minutes à température ambiante et transférer la phase aqueuse supérieure (éviter l'interphase qui contient les débris) dans un nouveau microtube.

## **2. 12. Electrophorèse sur gel d'agarose (Sinniger, 2001)**

### **✓ Principe**

En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont donc se déplacer vers l'anode, mais leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel dans lequel ils ont été placés. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc loin de leur point de départ.

### **✓ Technique**

#### **Préparation du gel d'agarose**

- Réaliser le gel d'agarose par dissolution à chaud de poudre d'agarose dans 200 ml tampon TBE 1X et refroidir jusqu'à une température voisine de 50°C.
- Couler le gel dans un moule dont les 2 extrémités ont été préalablement fermées par du ruban adhésif
- Disposer le peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel
- Laisser solidifier
- Enlever délicatement le peigne et le ruban adhésif
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse : les puits sont placés du côté de la cathode et la cuve est remplie de tampon TBE jusqu'au niveau supérieur du gel.

#### **Ensemencement**

- Répartir dans les tubes eppendorfs 20µl de chaque solution d'ADN
- Ajouter 5µl de tampon de charge
- Mélanger à l'aide d'une micropipette puis transférer les 25 µl des mélanges dans les puits du gel.



## **Migration**

Brancher le générateur après avoir raccordé la cuve. Appliquer un voltage de 90 volts pendant 4 heures.

## **Révélation**

Colorer le gel en l'immergeant dans une solution de TBE 1X contenant du BET à une concentration de 0,5 µg/ml pendant 30 à 45 minutes à température ambiante.

***PARTIE III***  
***RESULTATS ET DISCUSSION***

## 1. Résultats

### 1.1. Prélèvements

Sur une période de cinq mois (Avril à Juillet 2011), 153 prélèvements ont été réalisés dont 91 au niveau du service de réanimation, 24 prélèvements au niveau du service de chirurgie, 13 prélèvements au niveau du service de neurochirurgie et 25 prélèvements au niveau du service de l'O.R.L (Oto-rhino-laryngologie).

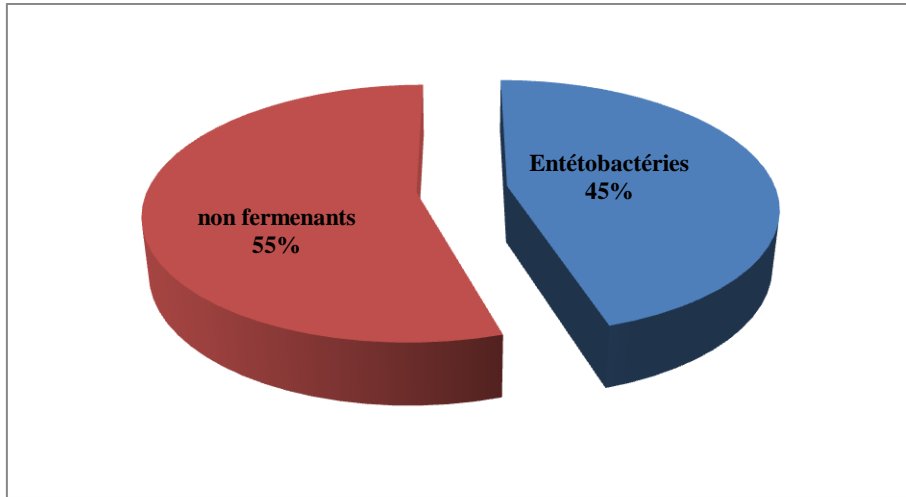
120 prélèvements ont été réalisés sur patients à partir de différents sites, dont 32 à partir de plaies chirurgicales, 31 à partir des sondes d'intubation, 05 des sondes vésicales, 15 des cathéters, 26 de prélèvements urinaires et 11 de prélèvements rectaux.

### 1.2. Souches étudiées

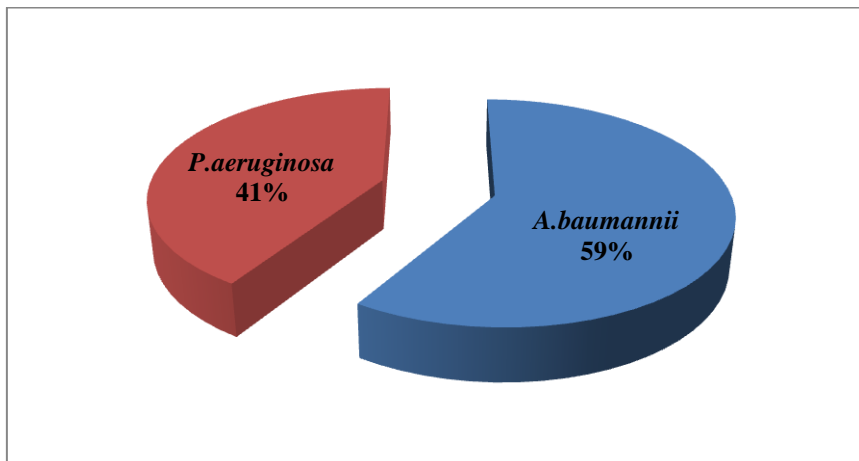
L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 115 bacilles à Gram négatif (BGN) dont 52 appartiennent à la famille des entérobactéries (45,21%) et 63 au groupe des non fermentants, ce qui correspond à une fréquence d'isolement de 54,78% (**Figure 7**).

Parmi les 63 bactéries non fermentants 56 ont été isolées à partir de 120 prélèvements effectués sur patients (88,88%) dont 23 *P. aeruginosa* (41,07%) et 33 *A. baumannii* (58,92%) (**Figure 8**).

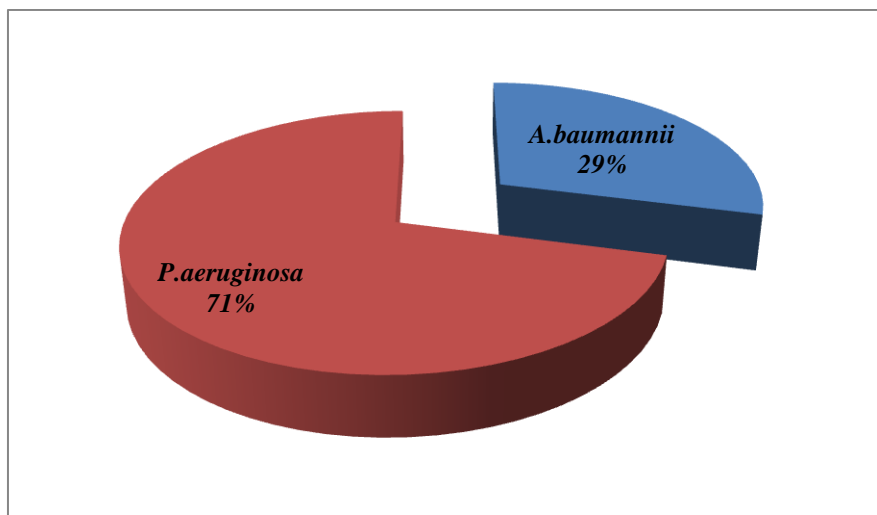
A partir de 33 prélèvements de l'environnement, 02 souches d'*A. baumannii* (28,57%) et 05 de *P. aeruginosa* (71,42%) ont été isolées (**Figure 9**).



**Figure 7. Répartition des bactéries non fermentants et des entérobactéries.**



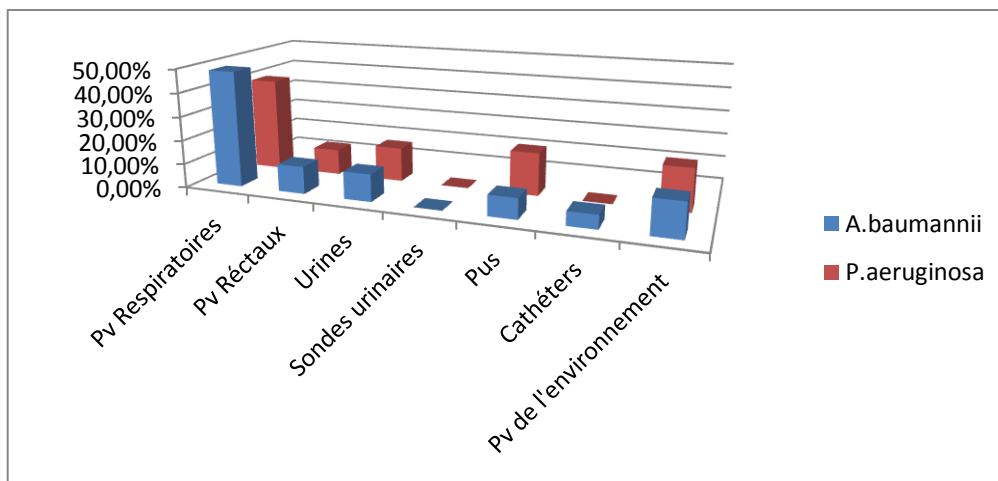
**Figure 8. Répartition d'*A. baumannii* et *P. aeruginosa* isolés à partir des patients**



**Figure 9. Répartition de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* à partir des prélèvements de l'environnement**

Les bactéries étudiées ont été isolées de différents services de l'hôpital et à partir de différents prélèvements, le service le plus étudié étant celui de réanimation au niveau duquel 94 BGN ont été isolés, dont 55,31% correspondent aux non fermentaires et 44,68% aux entérobactéries. Alors qu'au niveau des autres services les entérobactéries ont été isolées avec une fréquence de 47% et les non fermentants 53%.

La répartition de 63 souches appartenant aux Gram négatif non fermentants (35 *A. baumannii* et 28 *P. aeruginosa*) en fonction de la nature du prélèvement est comme suit : Prélèvements respiratoires (48,57% *A. baumannii*, 39,28% *P. aeruginosa*), prélèvements rectaux (11,42% *A. baumannii* et 10,71% *P. aeruginosa*), urines (11,42% *A. baumannii* et 14,28% *P. aeruginosa*), cathéters (5,71% *A. baumannii*), plaies chirurgicales (8,57% *A. baumannii* et 17,85% *P. aeruginosa*), aucune BGNF n'a été retrouvée au niveau des sondes urinaires. Au niveau des prélèvements de l'environnement *P. aeruginosa* occupe la première place avec un taux d'isolement de 17,85% (**Figure 10**).



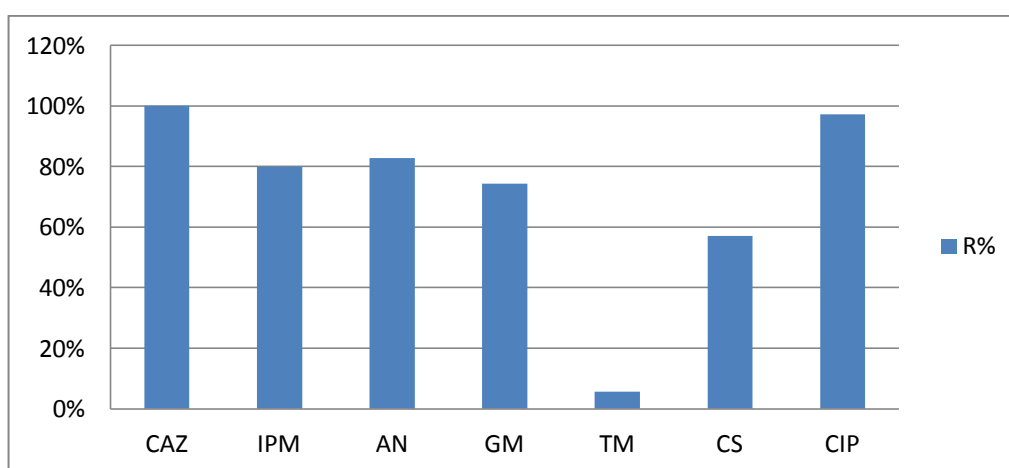
**Figure 10. Répartition des souches selon les prélèvements**

Pv : prélèvement.

### 1.3. Etude de la résistance aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii*

Les pourcentages de résistance aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii* ont été les suivants : 100% vis-à-vis de la ceftazidime, 80% vis-à-vis de l'imipénème, 82,85% vis-à-vis de l'amikacine, 74,28% vis-à-vis de la gentamicine, 5,71% vis-à-vis de la tobramycine, 57,14% vis-à-vis de la colistine et 97,14% vis-à-vis de la ciprofloxacine.

Dix souches sont résistantes à l'ensemble des antibiotiques testés à l'exception de la tobramycine (**Figure 11**).



**Figure 11. Taux de résistance aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii***

#### 1.4. Détermination des niveaux de CMI

Pratiquement toutes les souches étudiées sont apparues résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines testées (70%). Ces isolats présentent des niveaux élevés de CMI pour la ceftazidime (>512 $\mu$ g/ml), la pipéracilline (>512 $\mu$ g/ml), la ticarcilline (>512 $\mu$ g/ml) et l'imipénème (64 $\mu$ g/ml) (Tableau 2) (Annexe 7).

**Tableau 2 : Valeurs des CMI des  $\beta$ -lactamines ( $\mu$ g/ml)**

Souches	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	PIP $\leq 16 > 64$	TZP $\leq 16 > 64$	CAZ $\leq 4 > 8$	IPM $\leq 2 > 8$
A143	>512	>512	>512	>512	>512	32
A146	256	128	64	>512	8	2
A148	16	16	8	8	32	0,5
A151	>512	>512	>512	>512	>512	32
A152	>512	>512	>512	>512	256	64
A153	>512	>512	>512	>512	>512	64
A154	>512	>512	>512	512	>512	32
A159	>512	>512	>512	64	256	32
A161	>512	>512	>512	512	>512	32
A162	32	8	4	<1	32	0,5
A168	>512	>512	>512	>512	128	2
A169	>512	>512	>512	512	>512	32
A171	16	16	8	8	16	0,5
A173	>512	>512	>512	>512	>512	64
A174	>512	512	>512	>512	128	32
A176	>512	256	>512	>512	256	1
A177	>512	>512	>512	512	256	32
A179	>512	>512	>512	>512	256	64
A180	>512	>512	>512	>512	256	64
A183	>512	>512	>512	256	128	32

La moitié des souches sont résistantes à la gentamicine avec des CMI de 32 et 64  $\mu$ g/ml, 75% des souches sont résistantes à l'amikacine avec des CMI de 32 et 128  $\mu$ g/ml, la tobramycine reste l'aminoside le plus actif avec un bas niveau de CMI (>0,25 et 2 $\mu$ g/ml).

Près de la totalité des souches testées (80%) sont résistantes à la ciprofloxacine avec des CMI de 16 et 32  $\mu$ g/ml (Tableau 3) (Annexe 7).

**Tableau 3. Valeurs des CMI des aminosides et des fluoroquinolones ( $\mu\text{g/ml}$ )**

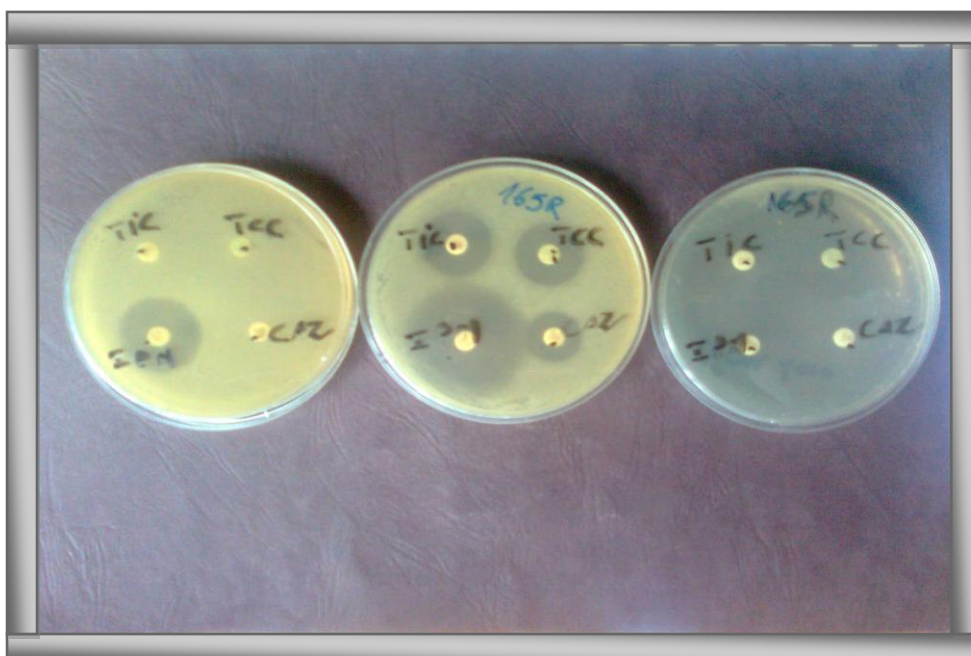
Souches	GM $\geq 16 < 16$	TM $\geq 16 < 16$	AN $\geq 17 < 15$	CIP $\geq 22 < 19$
A143	64	1	128	32
A146	2	2	32	1
A148	2	2	16	0,5
A151	64	1	128	32
A152	2	0,5	32	64
A153	64	2	64	8
A154	64	2	128	32
A159	32	0,25	32	32
A161	32	1	64	32
A162	<0,5	<0,25	<1	0,25
A168	<0,5	<0,25	4	16
A169	64	2	128	32
A171	<1	0,25	<1	0,25
A173	32	1	64	32
A174	2	1	16	16
A176	32	2	4	0,5
A177	2	0,25	32	32
A179	2	1	32	32
A180	2	0,5	32	32
A183	2	2	4	16

### 1.5. Test à la cloxacilline

La production de la céphalosporinase a été observée chez deux souches d'*A.*

*baumannii* testées : A 165 et A 175. Ce phénotype a été confirmé par la restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération en présence de concentration définie de cloxacilline (**Figure 12**).





**Figure 12. Résultat du test à la cloxacilline**

Une concentration de 500 $\mu$ g/ml permettait de récupérer l'activité de C3G utilisée.

### 1.6. Test de synergie

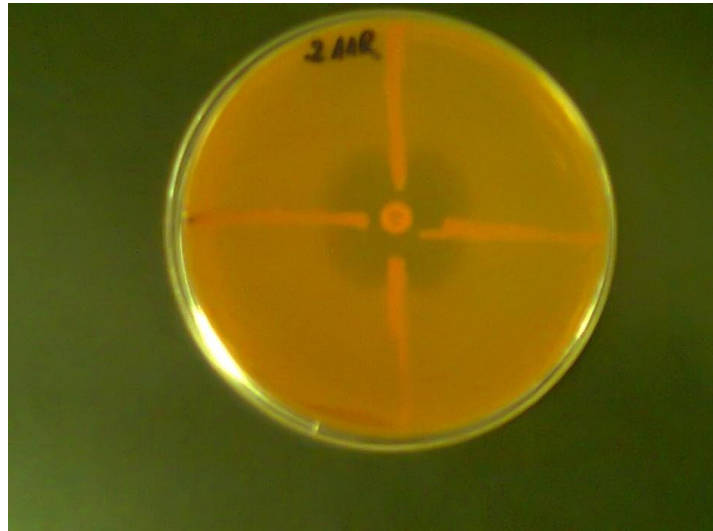
La recherche de BLSE, est réalisée grâce au test de synergie avec formation de l'image caractéristique en «bouchon de champagne » sur gélose de MH additionnée de cloxacilline avec une concentration finale de 500  $\mu$ g/ml.

Aucune souche n'a montré une image de synergie entre C3G et l'acide clavulanique traduisant la production de BLSE (**Figure 12**).

### 1.7. Recherche d'enzymes ayant une activité de carbapénèmases

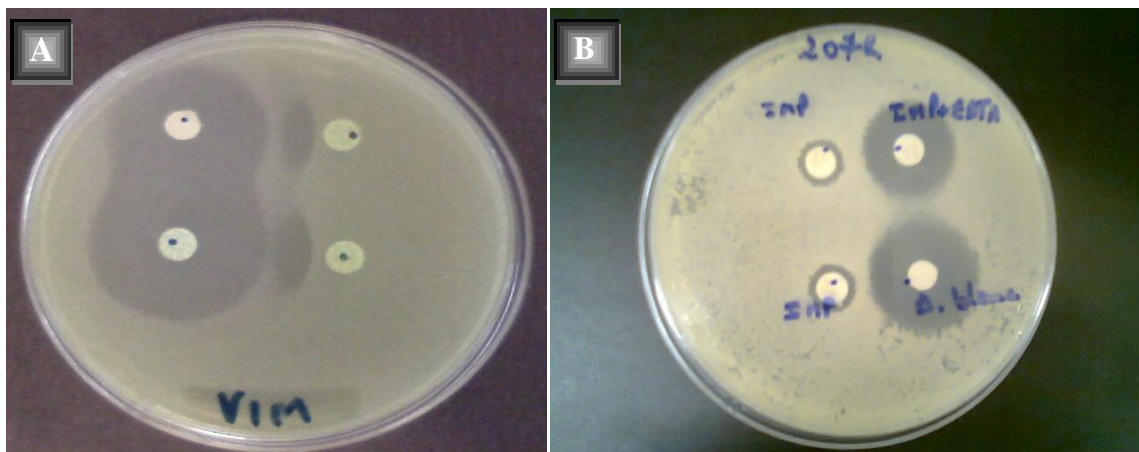
La recherche d'enzymes ayant une activité de carbapénèmases a été systématique chez les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème. Deux techniques phénotypiques ont été réalisées afin de chercher la présence de telles enzymes. Un témoin positif correspondant à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallob $\beta$ -lactamase VIM-1 a été utilisé.

Le test de Hodge permet la mise en évidence l'enzyme à activité carbapénémase. Toutes les souches d'*A. baumannii* testées se sont révélées positives (**Figure 13**).



**Figure 13. Résultat de test de Hodge**

Le test IMP-EDTA a permis de mettre en évidence les métallo- $\beta$ -lactamases. Les souches testées n'ont pas montré un accroissement de la zone autour du disque contenant l'IPM + EDTA, et aucune image de synergie n'a été observée. Les souches testées ne possèdent pas de métallo- $\beta$ -lactamases conférant leur résistance à l'imipénème (**Figure 14**).



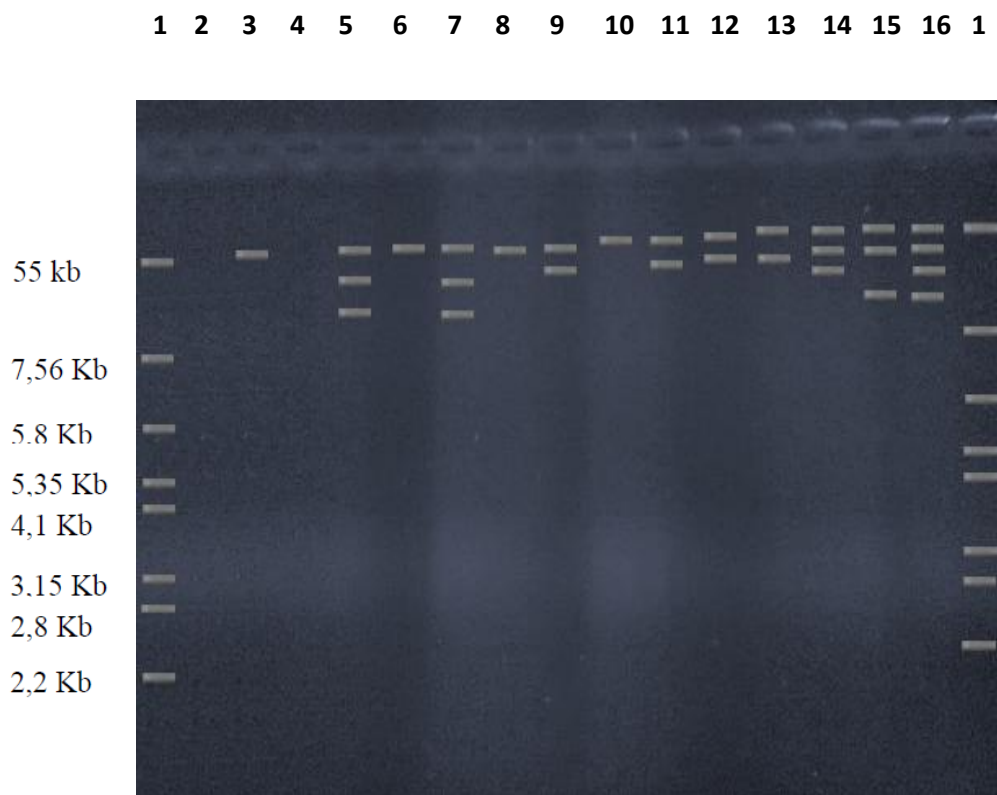
**Figure 14. Résultat du test à EDTA**

**(A) Souche de référence productrice d'une métallo- $\beta$ -lactamase (VIM-1), (B) Souche d'*Acinetobacter baumannii* testée.**

## 1.8. Plasmides : visualisation sur gel d'agarose

Les plasmides de 16 souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été extraits en utilisant la méthode de Kado et Liu (1981), les extraits ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose selon Sinniger (2001) dont la migration était liée inversement à leur poids moléculaire.

La description des profils plasmidiques pour les souches d'*A. baumannii* testées est illustrée sur la figure 15. Ces résultats nous révèlent une fréquence assez importante d'*A. baumannii* hébergeant plus d'un plasmide dont les tailles varient de 55 kb à 7,56 kb. Par ailleurs, ces souches portant des plasmides présentent une même bande plasmidique dont la taille approximative est de 55 kb.



**Figure 15. Visualisation des plasmides sur gel d'agarose.**

1 ( V517) ; 2 (A 149) ; 3(A 165) ; 4(A 183) ; 5 (A 155) ; 6 (A 189) ; 7 (A 191) ; 8 (A 188) ; 9 (A 207) ; 10 (A 195) ; 11 (A 138) ; 12 (A 159) ; 13 (A 210) ; 14 (A 161) ; 15(A 154).

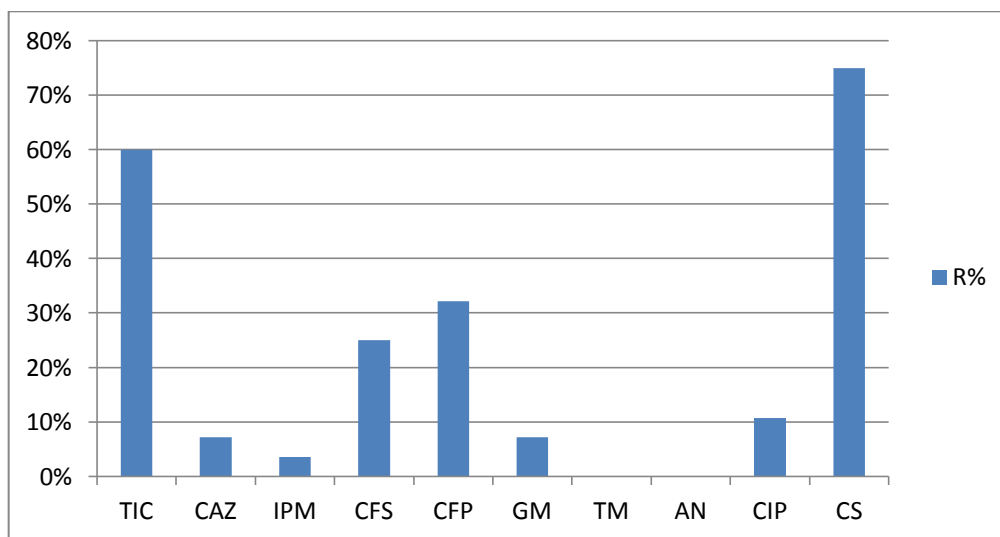
## 1. 9. Résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se sont révélées moins multirésistantes (32%) qu' *Acinetobacter baumannii* (94%).

Les taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines étaient les suivants : ticarcilline (60%), ceftazidime (7,14%), imipénème ( 3,57%), cefépime (32, 14%), cefsulodine (25%).

Pour la famille des fluoroquinolones, 10% des souches étaient résistantes à la ciprofloxacine.

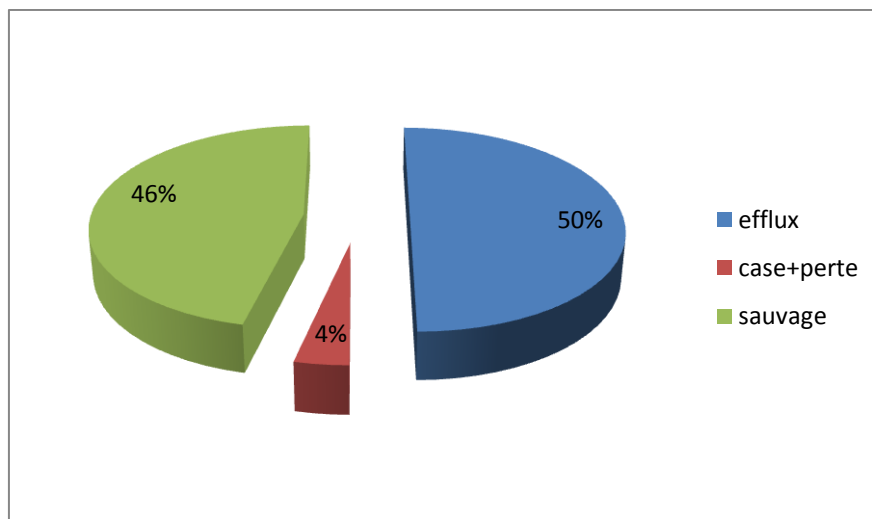
Un faible pourcentage a été observé pour la gentamicine (7,14%), alors que pour les deux autres aminosides, aucune résistance n'a été observée. 75% des souches sont en revanche résistantes à la colistine (**Figure 16**) (**Annexe 9**).



**Figure 16 : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.**

## 1. 10. Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines de *Pseudomonas aeruginosa*

La répartition des phénotypes de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines a révélé la prédominance d'un seul mécanisme non enzymatique représenté par l'efflux (50%). Les mécanismes enzymatiques étaient représentés par l'hyperproduction de céphalosporinase associée à une perte de porine OpreD2 (3,57%), le reste est représenté par le phénotype sauvage (46,42%) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Répartition des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

**de *P. aeruginosa***

Une seule souche (P360R) présente un niveau de résistance élevé à l'imipénème associée à une résistance à la ceftazidime, ce phénotype peut être attribué à une céphalosporinase AmpC associée au mécanisme perte OprD2.

Le phénotype d'efflux actif a été observé chez 14 souches qui se caractérisent par une diminution de l'activité de la ticarcilline (**Tableau 4**).

Le caractère inductible de la céphalosporinase chromosomique est observé par image d'antagonisme entre un inducteur de la céphalosporinase (imipénème) et son substrat (C3G).

**Tableau 4. phénotypes de résistance observés chez les souches de**

***Pseudomonas aeruginosa***

	TIC	CAZ	IPM	CFS	CFP	Mécanisme suspecté
<b>P16C</b>	R	R	R	R	R	Case +perte de porine OprD2.
<b>P360R</b>	R	S	S	R	S	Efflux

## 2. Discussion

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 63 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants isolées au niveau de CHU de Tlemcen. Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une légère prédominance d'*Acinetobacter baumannii* (55,55%) par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* (44,44%) dont la fréquence est probablement liée au caractère nosocomial des infections dans lesquelles elles sont impliquées.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont dans de plus de 32% des cas isolés à partir de service de réanimation dont les prélèvements concernés proviennent dans plus de la moitié des cas du tractus respiratoire suivis par les prélèvements réctaux, urinaires et de cathéters. Nos résultats concordent avec les données d'une étude marocaine décrivant l'importance de cette espèce surtout en unité de soins intensifs (**Elouennass., 2003**). Les principaux facteurs de risque dans ces services reconnus dans la littérature sont : la ventilation assistée, l'antibiothérapie à large spectre, la durée de séjour prolongée, le cathétérisme artériel et la sévérité de la pathologie sous-jacente (**Lahsoun et al., 2007**).

*Acinetobacter bamannii* est un germe saprophyte, répandu dans la nature, capable de survivre sur des surfaces et colonisant la peau des sujets sains, c'est une bactérie aérobic stricte souvent responsable d'épidémies d'infections nosocomiales dans les services de soins intensifs. La survenue d'épidémie est favorisée par sa tolérance à la dessiccation et son antibiorésistance naturelle contribuant au maintien de cette bactérie dans l'environnement hospitalier (**Lortholary et al., 1995, Fournier et al., 2006**).

La grande diversité des plasmides confèrent à la bactérie un grand potentiel d'acquisition des résistances. Aussi, l'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre sélectionne les souches multirésistantes (**Chastre, 2003**).

La fréquence de résistance aux antibiotiques a été élevée pour toutes les molécules étudiées y compris pour les  $\beta$ -lactamines, utilisées en première intention dans notre centre. *Acinetobacter baumannii* est une espèce qui dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action des antibiotiques (**Mansour et**

**al., 2008**), cette espèce possède des mécanismes de résistances naturelles aux  $\beta$ -lactamines, correspondant principalement à la production d'une céphalosporinase (ou  $\beta$ -lactamase de type AmpC) chromosomique. Ce mécanisme de résistance enzymatique peut être hyperproduit, il s'agit dans ce cas de la conséquence de l'insertion en amont du gène codant cette AmpC naturelle d'une séquence d'insertion appelée ISAbal qui apporte des séquences promotrices fortes (**Poirel et al., 2006**). A signaler que 100% de nos souches avaient une résistance à la ceftazidime, 90% à la ticarcilline et 85% à la pipéracilline, résultats proches à ceux apportés par plusieurs études (**Chahmout, 2011**). *Acinetobacter baumannii* possède également de manière naturelle une oxacillinase ayant une faible activité carbapénémase qui est l'OXA-69 (**Héritier et al., 2005**).

Pour la résistance acquise à l'imipénème plusieurs mécanismes peuvent intervenir: la modification de la cible ou la modification de la barrière de perméabilité. Ce dernier mécanisme, implique soit la mise en place de pompes à efflux, soit une diminution du flux entrant d'antibiotiques par l'intermédiaire des porines.

Chez *Acinetobacter baumannii*, la sous-expression d'une protéine homologue (38% d'identité) à la porine OprD de *Pseudomonas aeruginosa* a pu être associée à l'apparition d'un phénotype résistant aux carbapénèmes (**Nehmé et al., 2006**).

Pour les mécanismes de résistance enzymatiques, des enzymes de type KPC et des métallo- $\beta$ -lactamases ont été identifiées, mais chez cette bactérie, la résistance aux carbapénèmes est le fait essentiellement d'oxacillinases spécifiques (**Nordmann, 2010**). La détection phénotypique des métallo- $\beta$ -lactamases est fondée sur des critères habituels propres à cette classe : inhibition par l'EDTA (**Arlet, 2003**)

Récemment, le nombre de carbapénémases de type OXA a considérablement augmenté et ils ont été divisés en huit sous-groupes d'enzymes (**Cavallo et al., 2009**), quatre d'entre eux identifiés dans *A. baumannii* : OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 et OXA-51 qui constitue une famille d'enzymes chromosomiques présente dans *A. baumannii* (**Drissi et al., 2010**). Notre étude montre une résistance très élevée à l'imipénème (80%) principalement dans le service de réanimation (83,70%) il dépasse celui d'une étude marocaine qui est de 37% (**Arsalane et al., 2010**), dans une autre étude turque, elle rapporte que la résistance des isolats d'*Acinetobacter baumannii*

était augmenté considérablement de 43,3% à 72,9% pendant une période de 5ans (2003-2007) (**Dizbay et al., 2010**).

Les aminosides sont largement utilisés pour le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii*, mais un nombre croissant de souches hautement résistantes a été signalé depuis la fin des années 1970.

La cause la plus fréquente de la résistance d'*A. baumannii* aux aminosides est la modification de groupes hydroxyle ou amino de l'antibiotique par des enzymes. Tous les trois types d'enzymes de modification des aminoglycosides (acétylases, adénylases et phosphotransférases) ont été détectés dans des isolats cliniques d'*A. baumannii* mais avec des variations géographiques (**Looveren, 2004**). Ces enzymes peuvent compromettre l'activité de tous les membres de cette classe. Cela représente un mécanisme enzymatique de la majorité des isolats résistants, l'altération des protéines cibles ribosomales, le transport inefficace de ces agents dans des bactéries et des systèmes de pompe à efflux sont des mécanismes supplémentaires impliqués dans la résistance aux aminosides qui ne sont pas particulièrement significatifs chez les *Acinetobacter baumannii* (**Ferrara, 2006**).

Dans notre série la résistance à la gentamycine atteint 74% et celle de l'amikacine dépasse 82%. Cependant, la tobramycine reste l'agent le plus actif contre cette bactérie. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus dans une étude britannique (**Libera-Costa, 2003**).

La résistance des souches d'*A. baumannii* à la ciprofloxacine était très élevée (97,14%), ce résultat est en accord avec celle d'une étude roumaine qui rapporte que 93,1% des souches d'*A. baumannii* testées étaient résistantes à cet antibiotique (**Radu-Popescu, 2010**). Les fluoroquinolones sont des molécules couramment prescrites aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu extra hospitalier générant la sélection de souches résistantes avec le risque de transmission des gènes de résistance (**Heinemann, 2000**), cette résistance étant principalement liée d'une part à la modification de la cible (gyrase et topoisomérase IV), et d'autre part à l'augmentation d'un efflux actif (**Varon et al., 2002**).



Concernant la colistine, 57,14% des souches se sont révélées résistantes. *A. baumannii* peut développer une résistance aux polymyxines, par la modification du groupement phosphate de lipide A composant de lipopolysaccharide (LPS) (**Moffatt et al., 2010**).

En milieu hospitalier, l'épidémiologie de *P. aeruginosa* varie selon le type de l'unité concernée. Cette bactérie infecte préférentiellement les sujets hospitalisés dans les unités de soins intensifs et de chirurgie, services où le risque de colonisation et d'infection est important vu le terrain particulier des patients et la fréquence des manœuvres invasives.

Dans plusieurs études, *P. aeruginosa* a été isolé surtout chez des malades hospitalisés dans les services de réanimation, de chirurgie et d'ORL (**Benabdallah et al., 2008**).

Outre sa résistance naturelle à de nombreuses  $\beta$ -lactamines, *Pseudomonas aeruginosa* est caractérisé par sa capacité à acquérir de nouvelles résistances vis-à-vis de composés habituellement actifs. Les  $\beta$ -lactamines demeurant le plus souvent efficaces sont l'imipénème, la ceftazidime et l'association pipéracilline-tazobactam (**Bert et al., 2000**). L'acquisition de nouvelles résistances est facile et rapide, favorisée en milieu hospitalier par une forte concentration bactérienne et une pression de sélection par les antibiotiques, notamment ceux à large spectre (**Boutiba-Ben Boubaker et al., 2003**).

Dans cette étude, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une sensibilité élevée à tous les antibiotiques testés à l'exception de la ticarcilline (60%) et la colistine (75%). 3,57% ont présenté un niveau de résistance élevé à l'imipénème associé à une résistance à la ceftazidime.

La résistance à la ticarcilline est du probablement à un mécanisme non enzymatique, semble probablement liée à l'association d'une faible perméabilité de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* associée à une hyperexpression du phénomène d'efflux. Elle confère souvent un faible niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines anti-*Pseudomonas* autre l'imipénème. Elle touche essentiellement la ticarcilline puis l'aztréonam (**Cavallo et al., 1998**).

La résistance à l'imipénème est souvent liée à une perte de la porine D2 (OprD) et couplé à une faible hydrolyse par la céphalosporinase périplasmique (**Bricha et al.,**

2009), peut être expliquée par la forte consommation de l'imipénème dans l'hôpital de Tlemcen, où ce composé est prescrit pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* ( **Drissi et al., 2008**).

Chez *P. aeruginosa* la résistance à la colistine résulte d'une modification de LPS. En effet, la fixation de la colistine à la membrane externe est rendu possible grâce à des interactions électrostatiques entre les cations et les groupements négatifs portés par le LPS, la colistine franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite des composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatale pour la bactérie (**Vettoretti, 2009**).

En ce qui concerne les aminoglycosides, on remarque que l'amikacine et la tobramycine restent les antibiotiques les plus actifs. Cette constatation est aussi valable dans l'étude de Hamze et Dabboussi qui ont trouvé que la sensibilité de *P. aeruginosa* est de 71,5% à l'amikacine, 65,6 % à la gentamicine et 65,6 % à la tobramycine (**Hamze et al ., 2004**). Dans l'étude tricentrique française la sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* était de 73 % à la tobramycine et 86 % à l'amikacine (**Vachée et al ., 1997**).

Le taux de résistance à la ciprofloxacine (10%) a été un peu élevé à celui observé dans une étude réalisée dans le laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques » de l'université Abou Bekr Belkaïd à Tlemcen durant la période 2005-2006 qui était 4,7% (**Drissi et al., 2011**).

# ***CONCLUSION***

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des germes responsables de pathologies variées, fréquentes et parfois redoutables. Ce caractère redoutable des infections à bacilles à Gram négatif non fermentants est due en grande partie, au pouvoir toxique de ces agents infectieux et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

D'après les résultats de ce travail, l'analyse bactériologique des prélèvements cliniques émanant des différents services de CHU de Tlemcen a permis l'isolement des bactéries comportant *Acinetobacter baumannii*, bactéries qui ont montré un profil de multirésistance, et des souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à la ticarcilline et à la colistine.

En effet, la fréquence élevée des souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème est devenue un problème clinique important dans notre hôpital. La recherche de cette résistance par les méthodes phénotypiques a permis de détecter la présence probable de souches productrices de carbapénémases.

L'usage abusif des antibiotiques exerce une pression sur les micro-organismes, qui développent de la résistance par plusieurs mécanismes. L'évolution des résistances, comprenant l'apparition incessante de mécanismes nouveaux et la complexité des phénotypes de multirésistance, exige la mise au point rapide de nouveaux outils diagnostiques. Le développement de nouvelles stratégies, et la découverte de cibles nouvelles constituent une nécessité évidente. L'implémentation de mesures sensibles pour réduire les risques d'acquisition d'infections nosocomiales et la conduite des traitements sur des bases microbiologiques et pharmacologiques plus solides doivent constituer des priorités.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- 1. Andre M H., Lortholary O., Bryskier A., 1998.** Classification des antibiotiques : relation structure-activité. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine. 5-0015. P6
- 2. Alfred T., 2007.** Stenotrophomonas. Infection Control & Hospital Epidemiology Unit. The Alfred.
- 3. Allain P., 2008.** Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments. 3<sup>ème</sup> édition.
- 4. Arlet Guillaume., Philppon Alain., 2003.** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Revue française des laboratoires. 352 :41-55.
- 5. Arora U., Kaur S., Devi P., 2008.** *Ochrobactrum anthropi* septicaemia. Indian Journal of Medical Microbiology. 1: 81-83.
- 6. Arsalane L., Qamouss Y., Chafik A., Boughalem M., Louzi L., 2010.** Epidémiologie des bactéries multi résistantes dans un service de réanimation polyvalente d'un hôpital universitaire de Marrakech entre octobre 2006 et septembre 2009. Les technologies de laboratoire. 5: 21.
- 7. Avril Jean-Loup., Fauchère Jean-Louis., 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. P : 141.
- 8. Barbier F., Wolff M., 2010.** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique. Med Sci (Paris). 26(11): 960 – 968.
- 9. Brasme L., Vernet-Garnier V., 2009.** Perfectionnement en bactériologie. Association de biologie pratitienne.
- 10. Barrial K., Scotet J., 2006.** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif : Perspectives d'évolution ; DES Bactériologie. P :2.
- 11. Behera B., Mathur P., Das A., Kapil A., Sharma V., 2008.** An evaluation of four defferent phenotypic techniques for detection of metallo-betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. Indian Journal of Medical Microbiology. 26 (3): 233-37.
- 12. Ben Abdallah H., Noomen S., Ben Elhadj Khélifa A., Sahnoun O., Elargoubi A., Mastour M., 2008.** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir. Médecine et maladies infectieuses. 38(10): 554-556.
- 13. Bergogne-Bérézin E., Dellamonica P., 1999.** Antibiothérapie en pratique clinique. ED Masson. P 51.

- 14. Bert F., Lambert-Zechovsky N; 2000.** *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques*. 2(3): 195-201.
- 15. Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B., 2004.** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*. 6 (53): 341-348.
- 16. Boucher François, 2005.** Antibiothérapie en pédiatrie. Guide posologique des antibiotiques courants chez l'enfant.
- 17. Bounaadja Lotfi, 2010.** Développement d'une PCR en temps réel pour la détection de *Brucella* et relation avec le genre *Ochrobactrum*. Thèse de doctorat. P : 36.
- 18. Boutiba-Ben Boubaker I., Boukadida J., Triki O., Hannachi N., Ben Redjeb S., 2003.** Épidémie d'infections urinaires nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant aux antibiotiques. *Pathologie Biologie*. 51 (3): 147-150.
- 19. Bricha S., Ounine K., Oulkheir S., EL Haloui N. E., Attarassi B., 2009.** Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue tunisienne d'infectiologie*. 2 : 7 – 14.
- 20. Bryskier A, 1999.** Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. P: 747.
- 21. Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA., 1995.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39:1211-1233.
- 22. CA SFM., 2010.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- 23. Caillon Jocelyne, 2007.** Lecture et interprétation de l'antibiogramme.
- 24. Catherine S. Higgins., Matthew B. Avison., Lee Jamieson., Alan M. Simm., Peter M. Bennett., timothy R. Walsh., 2001.** Characterization, cloning and sequence analysis of the inducible *Ochrobactrum anthropi* AmpC  $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother* .47 (6): 745-754.
- 25. Cattoir Vincent, 2004.** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. 52 (10): 607-616.

- 26. Cattoir Vincent, 2008.** Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Pathologie infectieuse en réanimation. MAPAR. P: 208.
- 27. Cavallo J.D., De Mouy.D., Fabre R., Garrabe E., Armengaud M., 1998.** *Pseudomona aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995-1996. Méd mal infect. 28: 258-259.
- 28. Cavallo J.D., Plesiat P., Couetdic G., Leblanc F., Fabre R., 2002.** Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). J antimicrob chemother. 50 (6): 1039-1043.
- 29. Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., 2004.** Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1 : 129-202.
- 30. Changeur Nicolas., Marlène Cherruault., 2009.** Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides). P: 3.
- 31. Chastre Jean, 2003.** Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. Semin Respir Crit Car Med. 24(1): 069-078.
- 32. Clavilier L., Hervieu F., Letodé O., 2001.** Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques. Edition INRA. P35.
- 33. Conly J., Pitout J., Dalton B., Sabuta D., 2011.** La NDM-1 : summum de la résistance aux antimicrobiens. Centre de collaboration nationale des maladies infectieuses. 33:1.
- 34. Courvalin Patrice., 2000.** Rapport d'activité de l'unité Agents antibactériens pour l'année 1999. Institut Pasteur. <http://www.pasteur.fr/units/aab>.
- 35. Corvec Stéphane., Caroff Nathalie., Espaze Eric., Giraudeau Cécile., Drugeon Henri., Reynaud Alain., 2003.** AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J antimicrob chemother. 52 (4) :629-35.
- 36. Denis François., Marie-Cécile Ploy., Christian Martin., Edouard Bingen., Roland Quentin., 2007.** Bactériologie médicale : techniques usuelles. ED Masson. P : 333.



- 37. Dizbay M., Tunccan OG., Sezer BE., Hizel K., 2010.** Nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and risk factors. Scand J Infect Dis. 42(10):741-6.
- 38. Dortet Laurent., Legrand Patrick., Claude-James Soussy., Cattoir Vincent., 2006.** Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. J Clin Microbiol. 44(12): 4471–4478.
- 39. Drissi M., Baba Ahmed Z., Bkour R., Dehecq., Pésiat P., Hocquet D., 2008.** Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* : première étude en Algérie. Médecine et Maladies infectieuses. 4 (38) : 187-191.
- 40. Drissi M., Baba Ahmed Z., Bakour R., 2011.** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen Algérie. Phénotypes de résistance aux bêtalactamines. Médecine du Maghreb. Le kiosque. 184: 23-27.
- 41. Drissi M., Poirel L., Mugnier P. D., Baba Ahmed Z., Nordmann P., 2101.** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* Algeria. J Clin Microbiol Infect Dis. 29: 1457-1458.
- 42. Elouennass M ., Bajou T., Lemnouer A H ., Foissaud V., Hervé V., Baaj A J., 2003.** *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc. Médecine et maladies infectieuse. 7 (33) : 361-364.
- 43. Echemendia Yamile, 2007. The environmental reporter. Enviromental microbiology laboratory.5(7).**
- 44. Emile Carole, 2008.** Modalités de détection des BLSE chez les entérobactéries. Option Bio. 19 (396) : 18.
- 45. Emmanuel Evens, 2004.** Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques lies aux effluents hospitaliers. Thèse de doctorat.
- 46. Eric Scholar, 2008.** The Comprehensive Pharmacology. Repère médical. 48: 1-4.
- 47. Euzéby J P, 2003.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- 48. Euzéby JP, 2005.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- 49. Euzéby J P, 2008.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

- 50. Ezaitouni F., Rhou H., Benamar L., Ouzeddoun N., Bayahya R., Balafrej L., 1999.** Rein et aminosides. Médecine du Maghreb.77 :1.
- 51. Eyquem A., Alouf J., Montagnier L., 2000.** Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments. Piccin. Italie. P 45.
- 52. Faure Stéphanie, 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. P32.
- 53. Ferrara Anna M, 2006.** Potentially resistant non-fermentative Gram negative pathogens causing nosocomial pneumonia. International journal of antimicrobial agents 27(3): 183-195.
- 54. Féroni A., Abachin E., Quesnes G., Berche P., Sermet-Gaudelus I., Lenoir G., Gaillard G.L., 2003.** Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatif non fermentants isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. 51(7) : 405-411.
- 55. Gautam V., Singhal L., Ray P., 2011.** *Burkholderia cepacia* complex: Beyond pseudomonas and acinetobacter. Indian Journal of Medical Microbiology. 29 (1): 4-12.
- 56. Gautier Valérie., 2007.** Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole pratique des hautes études. P 13.
- 57. Gerischer Ulrike., 2008.** Acinetobacter molecular microbiology. Caister Academic Press. P 324.
- 58. Gueye Oulymata., 2007.** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification des bacilles à Gram négatif. Thèse de doctorat. P: 30-31.
- 59. Guillaume P .Y., 2004.** La microbiologie. Les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques.
- 60. Hamze M., Dabboussi F., Izard D., 2004.** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998–2001) au nord du Liban. Médecine et maladies infectieuses.34 (7) : 321-324.
- 61. Héritier Clair., Poirel Laurent., Fournier Pierre-Edouard., Claverie Jean-Michel., Raoult Didier., Nordmann Patrice., 2005.** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother 49(10): 4174–4179.

- 62. Heinimann B., Wisplinghoff H., Edmond M., Seifert H., 2000.** Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother* **44**: 2211–2213.
- 63. Hincky-Vitrat Virginie., 2008.** Les céphalosporines de 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> générations. Service de Maladies infectieuses et Tropicales., CHU Grenoble. P. 14.
- 64. Jacob Géraldine., 2003.** Implication des gènes de la régulation des céphalosporinases chromosomique d'*Enterobacter cloacae* dans le phénotype hyperproducteur de céphalosporinase. Thèse pour le doctorat en médecine. P. 21.
- 65. Jans B., Glupczynski Y., Suetens C., Van Cleemput E., 2004.** Enquête épidémiologique relative à *Acinetobacter baumannii* producteur de BLSE (Type VEB-1) en Belgique. Institut Scientifique de la santé publique. P:1-7.
- 66. Javaid Muhammad M., Rumjon Adam., Cubbon Marc., 2008.** *Ochrobactrum anthropi* Bacteremia in a Non-Diabetic, Immunocompetent Hemodialysis Patient. *Dialysis & Transplantation*. 37(11): 452-453.
- 67. Jean M., 2004.** Evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme. Atelier Santé Environnement. ENSP. P: 5-6.
- 68. Kado C.I., Liu S.T., 1981.** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriology*. 145 (3): 1365-1373.
- 69. Karyne Rangel Carvalho., Ana Paula d'Alincourt Carvalho-Asse., Gisèle Peirano., Lia Cristina Galvão dos Santos., Maria José Félix Pereira., Marise Dutra Asensi., 2009.** Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34 (1): 25-28.
- 70. Kettner M., P Milosevic., Hletkova M . J., 1995.** Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype 011. isolates. *Infection*. 23(6): 380-3.
- 71. Khalilzadeh Pouneh., 2009.** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat. P: 40.
- 72. Lafaurie M., 2008.** Aminosides et Fluoroquinolones. DU antibiotiques et antibiothérapie. Hôpital de Saint Louis.

- 73. Lahlou Amine I., Salord H., Gille Y., Roure C., Tigaud S., Tjou T., Rtabi N., Kassmi H.L., 2008.** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème : clone émergent en milieu hospitalier ?. Les Technologies de Laboratoire. N°11 : 4.
- 74. Lahsoun M., Boutayeb H., Zerouali K., Belabbes H., El Mdaghri N., 2007.** Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. Médecine et maladies infectieuses. 37 (12): 828-831.
- 75. Larouche Geneviève., 2001.** Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui. Pharmacothérapie théorique. Pharmacothérapie théorique. Pharmactuel.34(2) :40.
- 76. Laurent Frédéric., 2009.** Principales  $\beta$ -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G. Laboratoire de Microbiologie Groupement Hospitalier Nord Lyon. Monobactames Carbapénèmes.
- 77. Le Bourgeois Muriel., Vrielynck Stéphanie., 2005.** Infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose. Médecine Thérapeutique/ Pédiatrie. 8 (3): 157-81.
- 78. Lee K., Lim Y., Yong S D., Yum J. H., Y Chong., 2003.** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -Lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp.
- 79. Lepape A., 2007.** Impact de la résistance bactérienne sur les prescriptions d'antibiotiques. Congrès national d'anesthésie et de réanimation 2007. Conférences d'actualisation. P : 227-237.
- 80. Lie Souley Abdou Fousam Kourah., 2002.** Sensibilité et révolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du Point G. Thèse de doctorat. P 15.
- 81. Looveren Van M., Goossens H., 2004.** Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp in Europ. Clinical Microbiology and Infection. 10(8): 684-704.
- 82. Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S ., Boujaafar N ., 2008.** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). Pathologie Biologie. 56 (3) : 116-120.

- 83.** Marchand Isabelle., Damier-Piolle Laurence., Courvalin Patrice., Lambert Thierry., **2004.** Expression of the RND-Type Efflux Pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-Component system. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 48 (9): 3298-3304.
- 84.** Marie-Laure., Nadia Hidri ., **2004.** *Acinetobacter : Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z.* Editions HEALTH, Paris.
- 85.** Marrakchi CH., **2008.** Infections à *Acinetobacter*. *Rev Tun Infectiol.* 2(2): 28-30.
- 86.** Marty N., **2000.** Mode d'action des principaux antibiotiques utilisés chez le brûlé. *Brûlures.* Vol 1. Ed. Carr. Méd.
- 87.** Mérens Audrey., Aurélie Servonnet., **2010.** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *La résistance aux anti-infectieux. Revue francophone des laboratoires.* 422 : 33-41.
- 88.** Moniri R., Kheltabadi Farahani R., Gh Shajari., Nazem Shirazi MH., Ghasemi A., **2010.** Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *Acinetobacter* Spp. with emergence of multidrug-resistant strains. *Eranian Journal of public health.* 39(2): 63-68.
- 89.** Mohamed Darwish Noha Makram., **2009.** *Stenotrophomonas Maltophilia* a multi-drug resistant nosocomial pathogen. Master Degree in clinical and chemical Pathology. P2.
- 90.** Moffatt Jennifer H., Harper Marina., Harrison Paul., Hale John D. F., Vinogradov Evgeny., Seemann Torsten., Henry Rebekah., Crane Bethany., Michael Frank St., Andrew D. Cox., Adler Ben., Nation Roger L., Li Jian., Boyce John D., **2010.** Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (12): 4971-4977.
- 91.** Moniri R., Kheltabadi Farahani R., Shajari Gh., Nazem Shirazi Mh., **2009.** Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance in *Acinetobacter* Spp. with Emergence of Multidrug-Resistant Strains. *Iranian J Publ Health.* 39(2):63-68.
- 92.** Moulin Maurice., Coquerel Antoine., **2002.** *Pharmacologie.* Ed Masson.P : 1165.

- 93. Naas T., 2003.** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche de *Acinetobacter baumannii* productrice de la  $\beta$ -lactamase VEB-1. *Journal of clinical microbiology*. 41:3542-7.
- 94. Naas Thierry., Laurence Philippon; Laurent Poirel; Ronco Esthel; Nordmann Patrice;1999.** An SHV-Derived Extended-Spectrum-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(5): 1281-1284.
- 95. Nadjar David., Labia Roger., Cerceau Claude., Bizet Chantal., Philippon Alain., Arlet Guillaume., 2001.** Molecular Characterization of chromosomal class C  $\beta$ -lactamase and its regulatory gene in *Ochrobactrum anthropi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(8): 2324-2330.
- 96. Naija W., Chemchikh H., Farhat I., Bouallegue O., Toumi M., M'barek B., Ben Salma A., Chelbi S., Chaouch A., Saïd R., 2009.** Rifampicine-Colistine intraveineuse pour le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. 2 : 15 – 18.
- 97. Nicolas Jean-François., Cousin Florence., Thivolet Jean., 2002.** Antibiotiques : intolérance et allergie. ED John Libbey.
- 98. Nordmann Patrice., Poirel Laurent., Rodriguez-Martinez José-Manuel., Plésiat Patrick., 2009.** Naturally Occurring Class A  $\beta$ -Lactamases from the *Burkholderia cepacia* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(3): 876–882.
- 99. Nordmann P., Carrer A., 2010.** Les carbapénémases des entérobactéries. Edition Masson. 17 (4) : 154-162.
- 100. Pagès Jean-Marie., 2004.** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. Société de la revue médecine/sciences. Éditions EDK. 20(3): 346-351.
- 101. Parveen Mohamudha R., Harish B.N., Parija S.C., 2010.** AmpC beta lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 1517-8382.
- 102. Pechère Jean-Claude., Thilo Köhler., 2008.** Patterns and modes of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. 5(1): 15-18.
- 103. Pechère J.-C., Micha-Hamzhepour M., Kohler T., 1998.** L'efflux antibiotique, un mécanisme de résistance multiple chez *Pseudomonas aeruginosa*. Académie nationale de médecine, Paris, France. 182 (3): 599-615.

- 104. Perronne Christian., 1999.** Maladies infectieuses. Edition Doin. Paris. P: 65.
- 105. Peter Vandamme., 2009.** Identification des bactéries *Burkholderia cepacia*. Medical Scientific. 29 :65-69.
- 106. Philippon A., Arlet G., 2006.**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. Annales de biologie clinique. 64 (1): 37-51.
- 107. Poirel Laurent., 2006.** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. XVII<sup>e</sup> Congrès nationale de la SFHH-Nantes. P 25.
- 108. Poirel L., Nordmann P., 2006.** Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. Antibiotiques. Edition Masson. 8 (2) : 100-107.
- 109. Laurent Poirel., Samy Figueiredo and., Papa Anna., Nordman Patrice., 2009.** Overexpression of the Naturally Occurring *bla*<sub>OXA-51</sub> Gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel Insertion Sequence IS*Aba9*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 53(9): 4045-4047.
- 110. Potvin Éric., 2007.** Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*. Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval.
- 111. Pourriat Jan Louis., Martin claude., 2005.** Principe de réanimation chirurgicale. Edition ARNETTE. P298.
- 112. Radu-Popescu Manuela –Anda., Dumitriu Silvia., Enache-Soare Simona., Bancescu Gabriel., Udristoiu Aurelian., Cojocarus Manole., Vagu Codruta., 2010.** Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance patterns in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Romanian hospital. 58 (3): 6.
- 113. Rihova Z., Dratwa M., 2009.** *Ochrobactrum anthropi* Peritonitis in an Immunocompetent CAPD Patient. Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis. 29(6): 675-676.
- 114. Rodriguez-Villalobos H., Struelens M.-J., 2006.** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Réanimation. Edition Masson. 15 (3) : 205-213.
- 115. Romano Sara., Aujoulat Fabien., Jumas-Bilak Estelle., Masnou Agnès., Jeannot Jean-Luc., Falsen Enevold., Marchandin Hélène., Teyssier Corinne., 2009.** Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation. BMC Microbiology. 9 :267.

- 116. Rossignol Gaëlle., 2007.** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de doctorat. P : 7.
- 117. Ruppé E., 2010.** Epidémiologie des bêta lactamase-à spectre élargie : l'avènement des CTX-M. Infections bactériennes-Antibiotiques.12 (1) :5.
- 118. Sabin Charles., 2006.** La lectine PA-IIL de *Pseudomonas aeruginosa* : Structure, affinité et spécificité pour des ligands naturels et glycomimétiques. Thèse de doctorat. P. 14.
- 119. Saïdani.M., 2008.** Mécanismes de résistance bactérienne aux : aminosides, fluoroquinolones, glycopeptides. [www.infectiologie.org](http://www.infectiologie.org).
- 120. Sec Rose., 2005.** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat. P 17.
- 121. Segonds C., Chabanon G., Monteil H., 2006.** Espèces du complexe *Burkholderia cepacia*: épidémiologie, pathogénicité et résistance aux antibiotiques. Antibiotiques. 8 (1): 43-50.
- 122. Segonds C., Chabanon G., 2001.** *Burkholderia cepacia*: dangers of a phytopathogen organism for patients with cystic fibrosis. Ann Bio Clin. 59 (3) : 69-259.
- 123. Shafiqul Islam AHM., 2009.** Démonstration de particulariers la membrane externe et antigénique : Protéine (s) d'*Acinetobacter baumannii*. Thèse de doctorat. P5.
- 124. Sinha Mahua., H. Srinivasa., R. Macaden., 2007.** Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. Indian J Med. P 63-67.
- 125. Sougakoff Wladimir., Trystram David., 2003.** Résistance aux  $\beta$ -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine. P 59.
- 126. Sohikul Islam., 2008.** Mécanismes de résistance aux antibiotiques dans chromosomiques *Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria gonorrhoeae*. Thèse de doctorat. P 5.
- 127. Soussy C.-J. 2007.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. P: 21-46.



- 128. Speert David., 2002.** Infections au complexe *Burkholderia cepacia* chez les patients atteints de fibrose kystique - Questions les plus souvent posées. Fondation canadienne de la fibrose Kystique.
- 129. Steenhoek Justin., 2000.** *Burkholderia cepacia*. Emerging Infectious Disease. 4(2).
- 130. Straveta T., Ouzounova Raykova V., Markova B ., Tdorova A ., Marteva-Proevska ., Mitov I ., 2007.** Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. Journal of Chemotherapy. 19 (2): 140-145.
- 131. Thomas J., 2001.** New quinolones and the impact on resistance. Drug Discovery Today. 6(10): 529-536.
- 132. Tong Siau Ku., 2001.** *Burkholderia pseudomallei* flagelline Gene et son utilisation dans le typage des souches de virulence et d'analyse. National University of Sangapore.
- 133. Toure Fatoumata., 2004.** Résistance aux bêta-lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A.LE DANTEC. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P: 29-40.
- 134. Tulkens P., Spinewine A., 2002.** Pharmacologie spéciale-Les aminoglycosides. Pharmacologie et pharmacothérapie des anti-infectieux. Université catholique de Louvain.
- 135. Vachée A ., Scheftel JM ., Husson MO., Izard D., Ross P., Monteil H ., 1997.** Tricentric study of the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* serotyping to beta-lactams and aminoglycosides. Pathol Biol (Paris). 45(5):357-362.
- 136. Van J.C Nguyen., Gutmann.L., 1994.** Résistance aux antibiotiques par diminution de la perméabilité chez les bactéries à Gram négatif. Presse médicale. 23 (11): 522-531.
- 137. Van Looveren M., Goossens H., 2004.** The ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp* in Europe. Clinical Microbiology and Infection :10(8)684-704.
- 138. Varon Emmanuelle., Gutmann Laurent., 2002.** Epidémiologie des infections à pneumocoque ; épidémiologie des résistances. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 5(2): 5-20.

- 139. Vedel G, 2005.** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 56(4): 657-664.
- 140. Vettoretti Leuci., 2009.** Adaptation des mécanismes de résistance par efflux actif chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose. Thèse de doctorat.
- 141. Vora S., Auckenthaler R., 2010.** Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique ?. *Revue Médicale Suisse*. N°220.
- 142. Wang Chanxin., Cai Peiquan., Chang Dong., Mi Zuhuang., 2006.** A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (6): 1261-1262.
- 143. Wiczorek P., Sacha P., Hauschild T., Zórawski M., Krawczyk M., Tryniszewska E., 2008.** Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* –the role of Ade ABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 46 (3): 257-267.
- 144. Zahar J.R., Grall I., Kouatchet A.T., 2010.** Carbapénèmes: nouvelles molécules, différentes indications ?. *La lettre de l'infectiologue*. 25 (4) : 142-146.
- 145. Zhanel George G., Johanson Christel., Embil John M., Noreddin Ayman., Daryl J., 2005.** Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 3(1): 23-39.
- 146. Zhang Li., Xian-Zhi Li., Poole Keith., 2001.** SmeDEF Multidrug Efflux Pump Contributes to Intrinsic Multidrug Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(12): 3497-3503.

# ***ANNEXES***

**Annexe 1. Tableau de lecture de la Galerie API 20 NE**

TESTS	SUBTRACTS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO3	Potassium nitrate	réduction des nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2/5min	
			incolore	rose
		réduction des nitrates en azote	Zn / 5mn	
			rose	incolore
TRP	L-tryptophane	formation d'indole	James/ immédiate	
			Incolore/vert pale/jaune	rose
GLU	D-Glucose	fermentation	bleu vert	jaune
ADH	L-arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange/rose/rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange/rose/rouge
ESC	esculine citrate de fer	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase)	jaune	Gris/marron/noir
GEL	gélatine (origine bovin)	Hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophénil- $\beta$ D-galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	incolore	jaune
GLU	D-glucose	assimilation	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	assimilation	transparence	trouble
MNE	D-mannose	assimilation	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	assimilation	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
MAL	D-maltose	assimilation	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	assimilation	transparence	trouble
CAP	acide caprique	assimilation	transparence	trouble
ADI	acide adipique	assimilation	transparence	trouble
MLT	acide malique	assimilation	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	assimilation	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	assimilation	transparence	trouble

**Annexe 2. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa* (CA SFM, 2010)**

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Ticarcilline	75 µg	≤16	> 16	≥22	< 22
Ticarcilline/ac.clavulanique	75/10µg	≤16/2	> 16/2	≥22	< 22
Pipéracilline	75 µg	≤16	> 16	≥18	< 18
Pipéracilline/tazobactam	75/10µg	≤16/4	> 16/4	≥ 19	< 19
Imipénème	10 µg	≤ 4	> 8	≥22	< 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥22	< 15
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥24	< 19
Aztréonam	30 µg	≤1	> 16	≥ 27	< 19
Ceftazidime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19
Céfépime	30 µg	≤ 8	> 8	≥19	< 19
Cefpirome	30 µg	≤ 8	> 8	≥19	< 19
Tobramycine	10 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Amikacine	30 µg	≤8	> 16	≥ 17	< 15
Iséпамicine	30 µg	≤8	> 16	≥ 17	< 15
Gentamicine	15 µg	≤4	> 4	≥ 16	< 16
Nétilmicine	30 µg	≤4	> 4	≥19	< 19
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2		
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Lévofloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 20	< 17
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤32	> 32	≥14	< 14
Sulfamides	200 µg	≤64	> 256	≥17	< 12

**Annexe 3. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia* (CASFM,2010).**

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Sulbactam		≤ 8			
Ticarcilline	75 µg	≤16	> 64	≥22	< 18
Ticarcilline/ac.clavulanique	75/10 µg	≤16/2	> 64/2	≥22	< 18
Pipéracilline	75 µg	≤ 16	> 64	≥ 18	< 12
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤16/4	> 64/4	≥19	< 14
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	10 µg	≤2	> 8	≥22	< 15
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
Ceftazidime	30 µg	≤4	> 8	≥ 21	< 19
Céfépime	30 µg	≤ 4	> 8	≥21	< 19
Cefpirome	30 µg	≤4	> 8	≥ 21	< 19
Tobramycine	10 µg	≤ 4	> 4	≥16	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Iséamicine	30 µg	≤ 8	> 16	≥17	< 15
Gentamicine	15 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
Nétilmicine	30 µg	≤ 4	> 4	≥19	< 19
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 23	< 19
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥19	< 17
Colistine	50 µg	≤2	> 2	≥15	< 15
Péfloxacine	5 µg	≤ 1	> 4	≥22	< 16
Ofloxacine	5 µg	≤ 1	> 1	≥22	< 22
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 1	> 1	≥ 22	< 22
Lévofloxacine	5 µg	≤1	> 2	≥20	< 17
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤ 4/76 ≤2/38	> 4/76 > 4/76	≥13 ≥16	< 13 < 13

--	--	--	--	--	--

**Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin, 2006)**

<b>Solution initiale (µg /ml)</b>	<b>Solution mère (ml)</b>	<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>Concentration obtenue (µg/ml)</b>	<b>Concentration finale dans le milieu (µg/ml)</b>
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

## **Annexe 6. Solution et tampon pour l'extraction de l'ADN plasmidique**

**(Kado et Liu, 1981)**

- **Solution de lyse**

SDS (Sigma).....3%

Tris (Sigma).....50mM pH 12,6

- **Tampon TE**

Tris.....50mM

EDTA.....10mM



**Annexe 6. Tampons et solutions pour électrophorèse de l'ADN plasmidique  
(Sambrook et Russel, 2001)**

- **Tampon TBE 5X**

Tris base.....	54 g
Acide borique .....	27, 5 g
EDTA 0,5 M.....	2ml
Eau distillée .....	q.s.p 1 litre

- **Tampon de charge**

Glycérol .....	3 ml
Bleu de bromophénol .....	75 mg
Eau distillée .....	7 ml

## Annexe 7. Résultats des CMI des souches d'*Acinetobacter baumannii*

- $\beta$ -lactamines

Souches	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	PIP $\leq 16 > 64$	TZP $\leq 16 > 64$	CAZ $\leq 4 > 8$	IPM $\leq 4 > 8$
A143	>512	>512	>512	>512	>512	32
A146	256	128	64	>512	8	2
A148	16	16	8	8	32	0,5
A151	>512	>512	>512	>512	>512	32
A152	>512	>512	>512	>512	256	64
A153	>512	>512	>512	>512	>512	64
A154	>512	>512	>512	512	>512	32
A159	>512	>512	>512	64	256	32
A161	>512	>512	>512	512	>512	32
A162	32	8	<1	4	32	0,5
A168	>512	>512	>512	<1	128	2
A169	>512	>512	>512	512	>512	32
A171	16	16	8	8	16	0,5
A173	>512	>512	>512	>512	>512	64
A174	>512	512	>512	>512	128	32
A176	>512	256	>512	>512	256	1
A177	>512	>512	>512	512	256	32
A179	>512	>512	>512	>512	256	64
A180	>512	>512	>512	>512	256	64
A183	>512	>512	>512	256	128	32

- **Aminosides et fluoroquinolones**

<b>souches</b>	<b>GM</b> $\geq 16 < 16$	<b>TM</b> $\geq 16 < 16$	<b>AN</b> $\geq 17 < 15$	<b>CIP</b> $\geq 22 < 19$
<b>A143</b>	<b>64</b>	<b>1</b>	<b>128</b>	<b>32</b>
<b>A146</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	<b>1</b>
<b>A148</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>0,5</b>
<b>A151</b>	<b>64</b>	<b>1</b>	<b>128</b>	<b>32</b>
<b>A152</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>32</b>	<b>64</b>
<b>A153</b>	<b>64</b>	<b>2</b>	<b>64</b>	<b>8</b>
<b>A154</b>	<b>64</b>	<b>2</b>	<b>128</b>	<b>32</b>
<b>A159</b>	<b>32</b>	<b>0,25</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>A161</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>32</b>
<b>A162</b>	<b>&lt;0,5</b>	<b>&lt;0,25</b>	<b>&lt;1</b>	<b>0,25</b>
<b>A168</b>	<b>&lt;0,5</b>	<b>&lt;0,25</b>	<b>4</b>	<b>16</b>
<b>A169</b>	<b>64</b>	<b>2</b>	<b>128</b>	<b>32</b>
<b>A171</b>	<b>&lt;1</b>	<b>0,25</b>	<b>&lt;1</b>	<b>0,25</b>
<b>A173</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>32</b>
<b>A174</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>A176</b>	<b>32</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0,5</b>
<b>A177</b>	<b>2</b>	<b>0,25</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>A179</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>A180</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>A183</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>16</b>

## Annexe 8. Résultats de l'antibiogramme des souches d'*Acinetobacter baumannii*

- $\beta$ -lactamines, aminosides, fluoroquinolone et colistine

Souches	CAZ $\geq 21 < 19$	IPM $\geq 24 < 17$	GM $\geq 16 < 16$	AN $\geq 17 < 15$	TM $\geq 16 < 16$	CIP $\geq 22 < 22$	CS $\geq 15 < 15$
133R	R	R	R	R	S	R	S
134R	R	S	R	S	R	R	S
136R	R	R	R	R	S	R	S
137R	R	R	R	R	S	R	S
138R	R	R	R	R	R	R	S
139R	R	R	S	S	S	R	S
140R	R	R	R	R	S	R	S
141R	R	R	R	R	S	R	R
143R	R	R	R	R	S	R	R
155R	R	R	R	R	S	R	R
158R	R	R	R	R	S	R	R
160R	R	R	R	S	S	R	R
164R	R	R	R	R	S	R	R
165R	R	S	R	R	S	R	R
173R	R	R	S	R	S	R	S
175R	R	R	R	S	S	S	R
176R	R	R	S	R	S	R	S
180R	R	R	S	R	S	R	S
A183	R	S	S	S	S	S	S
186R	R	R	R	R	S	R	S
187R	R	R	R	R	S	R	S
189R	I	S	S	S	S	I	R
191R	R	R	R	R	S	R	S
195R	R	S	R	R	S	R	R
198R	R	S	S	R	S	R	R
203R	R	R	S	R	S	R	R
207R	R	R	S	S	R	R	R
210R	R	R	R	R	S	R	R
211R	R	R	R	R	S	R	R
217R	R	R	R	R	S	R	R
219R	R	R	S	R	S	R	R
A13C	R	R	R	R	S	R	R
A17C	R	S	R	S	S	R	R
A22C	R	R	S	R	S	R	R

**Annexe 9. Résultat de l'antibiogramme des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.**

- $\beta$ -lactamines, aminosides, fluoroquinolones et colistine.

Souches	TIC ≥22<22	CAZ ≥19<19	CFS ≥19<19	CFP ≥19<19	IPM ≥22<17	GM ≥16<16	AN ≥17<15	TM ≥16<16	CIP ≥25<22	CS
P137	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P141	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P144	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
P145	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
P146	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P147	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P148	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
P149	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P150	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P151	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
P152	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R
P167	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P174	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
P175	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
P176	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P183	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
P186	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
P187	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
P188	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P192	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P193	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
P194	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P195	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P206	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
P207	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
P208	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
P209	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P211	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R

## ملخص

الجراثيم سلبية الغرام غير المخمرة هي مسببات الأمراض الانتهازية مسؤولة عن عدوى المستشفيات . الحساسية الى خمسة  $\beta$ -لاكتامين, ثلاثة امينوجليكوزيد و فليوروكينولون واحد درست على 63 سلالة المعزولة من 153 عينة من المستشفى الجامعي لتلمسان .

*Acinetobacter baumannii* هو النوع البكتيري الاكثر شيوعا في الاصابة المعزولة المكتسبة و هذا لاجتماع عدة آليات للمقاومة ضد عدة عائلات من المضادات الحيوية. من بين 35 سلالة من *Acinetobacter baumannii* , 80% منها أظهرت مقاومة للاميبينيم بمستوى يعادل 64 ميكروغرام في الملتر, التوبرامسين هو المضاد الحيوي الأكثر تأثيرا من, 5,71% هذه السلالة أظهرت مقاومة لهذا الأخير. تعتبر سلالات *Pseudomonas aeruginosa* اقل مقاومة من *Acinetobacter baumannii* . من بين 28 سلالة , 50% قدمت آلية efflux في حين الافراز cephalosporinase المرتبط بفقْدان porine OprD<sub>2</sub> لم يلاحظ إلا بنسبة 3,57%.

الكلمات المفتاحية : *Acinetobacter baumannii* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، مضادات حيوية ، مقاومة.

## Résumé

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales. La sensibilité à cinq  $\beta$ -lactamines, à trois aminosides et à une fluoroquinolone a été étudiée sur 63 souches isolées de 153 prélèvements au niveau de CHU de Tlemcen. *Acinetobacter baumannii* est une des espèces les plus impliquées dans les infections nosocomiales du fait de l'association de plusieurs mécanismes de résistance. Sur un total de 35 souches d'*A. baumannii*, 80% ont présenté une résistance à l'imipénème avec un niveau de CMI de 64 $\mu$ g/ml. La tobramycine est l'antibiotique le plus actif avec 5,71% de souches résistantes. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont moins multirésistantes que celles d'*Acinetobacter baumannii*. En effet, sur un total de 28 souches, 50% ont présenté un mécanisme d'efflux alors que le phénotype de céphalosporinase (3, 57%) associé à une perte de porine OprD<sub>2</sub> a été moins observé.

**Mots-Clés :** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotiques, résistance.

## Abstract

The Gram negatif non-fermenting bacteria are opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections. The sensitivity to five  $\beta$ -lactams, three aminoglycosides and to one fluoroquinolone was studied in 63 strains isolated from 153 samples at the University Hospital of Tlemcen. *Acinetobacter baumannii* is the species most involved in nosocomial infection due to the combination of several mechanisms resistance. A total of 35 strains of *A. baumannii*, 80% presented resistance to imipenem with an MIC level 64 $\mu$ g/ml. tobramycine is the most active agent, 5, 71% of the isolates being resistant. *Pseudomonas aeruginosa* strains are less multidrug resistant than of *Acinetobacter baumannii*. Indeed, a total of 28 strains, 50% presented an efflux mechanism, while the phenotype cephalosporinase (3, 57%) associated with a loss of porin was OprD<sub>2</sub> unless noted.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, resistance.

