

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

UNIVERSITE DE TLEMCCEN
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(LAMAABE)*

MEMOIRE

Présenté par

**ABDELLI ILHEM
SAID MEDJAHED SANA**

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

Etude de la résistance aux antibiotiques de
Pseudomonas aeruginosa au niveau du CHU de Tlemcen

Soutenu le 10 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Présidente	Mme BENDIMERAD Nahida	MCB	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme MERAD BOUDIA Esma	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Aboura M'Hamedi Imène	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire: 2019/2020

Remerciements

*Avant tous nous tenons à remercier **Allah** le tout puissant qui nous a*

Donné la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et à remercier madame

MERAD BOUDIA ESMA

Pour son encadrement, sa confiance, ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail

*Nous prenons aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement tous le personnel de **Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)** de Tlemcen dans lequel nous avons pu réaliser nos travaux du mémoire.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements à l'équipe des services de **réanimation, de orthopédie-traumatologie, de chirurgie et médecine interne** au niveau du CHU de Tlemcen pour leur accueil , et d'avoir mis à notre disposition le personnel et pour leur aide.*

Nous adressons de sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de Juger ce travail.

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

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études

A

A ma cher mère ; mon trésor, ma source de tendresse ; mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celle qui m'a transmis la vie, l'amour et le courage. Que dieu te garde pour moi,

A mon cher père ; mon exemple éternel, celui qui a tout fait pour moi, pour sa confiance ; son soutien, pour les sacrifices qu'il a consenti pour mon bien être. Que dieu te garde pour moi,

Pour ma chère sœur Nassima qui m'a donnée toujours espoir pour relever ce défi et pour son temps précieux qu'elle m'accorde toujours.

A mon cher frère Sidahmed ; mon bonheur dans la vie que Dieu te garde pour moi.

A Sana ; mon binôme avec lequel j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Nous avons formé une belle équipe, je te remercie.

Ilhem

DEDICACES

Je dédie humblement ce manuscrit à:

A mon très cher père, mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Même si tu n'es plus là tu resteras toujours bien vivant dans mon cœur et dans ma vie. Que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

Papa, j'espère que tu es fier aujourd'hui....

Ma très chère mère, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

J'espère d'être toujours avec moi....

Ma chère sœur Saliha et mes chers frères Samir et Soufyane, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de ma vie. Je dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite....

Mes chers défunts, que Dieu les accueille dans son vaste paradis...

A toute ma famille petits et grands , ma binôme et à tous ceux qui me sont les plus proches

Sana

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
INTRODUCTION.....	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Caractères généraux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	04
1. Historique-taxonomie.....	04
2. Habitat et distribution environnementale.....	04
3. Caractères bactériologiques.....	04
4. Pouvoir pathogène.....	06
5. Facteurs de virulence	07
Chapitre II : Antibiotiques.....	09
1. β-lactamines.....	09
1.1. Structure et classification.....	09
1.2. Mécanisme d'action.....	13
2. Aminosides	13
2.1. Structure et classification.....	14
2.2. Mécanisme d'action.....	14
3. Les fluoroquinolones.....	15
3.1. Structure et classification.....	15
3.2. Mécanisme d'action.....	16
4. Colistine.....	16
4.1. Mécanisme d'action.....	17
5. Les sulfamides.....	18
5.1. Mécanisme d'action.....	18
6. Le Triméthoprime.....	18
6.1. Mécanisme d'action	18
Chapitre III : Mécanismes de résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	19
1. Résistance aux β-lactamines.....	19
1.1. Résistance naturelle.....	19
1.2. Résistance acquise	19
1.2.1. Mécanisme enzymatique.....	20
1.2.2. Mécanisme non enzymatique.....	22
2. Résistance aux aminosides.....	23
3. Résistance aux fluoroquinolones.....	25
4. La résistance à la colistine	25

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude.....	28
2. Prélèvements.....	28
3. Isolement et purification.....	28
4. Identification.....	28
4.1. Examen macroscopique des cultures.....	29
4.2. Etude des caractères biochimiques.....	29
4.2.1. Test d'oxydase.....	29
4.2.2. Galerie API 20E	29
5. Conservation des souches.....	32
6. Antibiogramme	32
6.1. Les antibiotiques testés.....	32
6.2. Principe.....	33
6.3. Lecture.....	33

Troisième partie : Résultats et discussion

I. Résultats	35
1. Prélèvements.....	35
2. Répartition des souches identifiées.....	35
3. Identification des souches.....	37
3.1. Aspect macroscopique des colonies.....	37
3.2. L'identification biochimique.....	38
3.2.1. Test d'oxydase.....	38
3.2.2. Résultat de la galerie API 20E	39
2. Discussion	40
CONCLUSION.....	45
Références bibliographiques.....	48
ANNEXES.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques.....	07
Tableau 2. Répartition des prélèvements selon les types de prélèvements.....	28

Liste des figures

Figure 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observée au microscope électronique.....	5
Figure 2. Les principaux facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	8
Figure 3. Le noyau de β -lactame.....	10
Figure 4. Structure générale d'une pénicilline.....	10
Figure 5. Structure générale d'une céphalosporine.....	11
Figure 6. (a) Structure générale et (b) Structures chimiques de différentes carbapénèmes....	12
Figure 7. Structure générale des monobactames.....	12
Figure 8. Les différentes structures des inhibiteurs de β -lactamases.....	13
Figure 9. Structure générale d'un aminoside.....	14
Figure 10. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine.....	15
Figure 11. Structure chimique de la polymyxine B et de la colistine.....	17
Figure 12. Mécanisme d'action des sulfamides et triméthoprimé	18
Figure 13. Répartition des prélèvements selon les services.....	34
Figure 14. Répartition des bacilles à Gram négatif non fermentants et des entérobactéries...35	
Figure 15. Le taux des différents bacilles à Gram négatif isolés.....	35
Figure 16. Répartition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon les services de prélèvements.....	36
Figure 17. Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur cétrimide..37	
Figure 18. Test oxydase positive d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Figure 19. Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API 20E.....	38
Figure 20. Le biotype de la souche identifiée <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIM: Australia Imipenemase

AME: Aminoglycoside modifying enzyme

AmpC : β -lactamase de classe C ou céphalosporinase

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATB : Antibiotiques

BEL: Belgium Extended-Spectrum β –lactamase

BGN : Bactéries à Gram négatif

BGNnF : Bacilles à Gram négatif non fermentants

BHIB : Bouillon cœur cerveau

BLSE : Les β -Lactamases à Spectre Etendu

BMR : Bactérie Multi-Résistantes

CARB : Carbenicillin-hydrolyzing Bêta-lactamase

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DOS : Désoxystreptamine

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

GES: Guyana Extended-Spectrum β –lactamase

GIM: German Imipenemase

IMP: Imipenemase (carbapénémases)

LPS: lipopolysaccharide

MBL: Métallo- β -lactamase

NAG: N-Acétyl Glucosamine

NAM: Acide N-Acétyl-Muramique

NDM: New-Delhi Métallo-B-lactamase

OprD : Outer membrane protein *D*

OXA : Oxacillinases

PA / *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

PAB : acide para-amino-benzoïque

PAMR : *Pseudomonas aeruginosa* Multi-Résistantes

PER: Pseudomonas Extended Resistance

PLPs : Protéine Liant les Pénicillines

PSE: *Pseudomonas* Specific Enzyme

QRDR: Quinolone Resistance Determining Regions

SHV: Sulfhydryl reagent Variable

SPM: Sao-Paulo Metallo- β -lactamase

TEM: Temoneira : nom du patient

VEB: Vietnam Extended-Spectrum β -lactamase

VIM: Verona Imipenemase (carbapénémases)

الملخص

Pseudomonas aeruginosa هي إحدى البكتيريا المسببة للأمراض الانتهازية تتميز بقدرتها على الاستمرار والمقاومة في بيئة المستشفى للمضادات الحيوية. في هذه الدراسة من إجمالي 32 عضية سالبة (BGN) تم تحديدها من المستشفى الجامعي لتلمسان. 14 سلالة تنتمي إلى مجموعة عديمة التخمر (BGNNF) بمعدل (43.75%) ، بما في ذلك 09 من سلالة (64.28%) *Pseudomonas aeruginosa* و 05 *Acinetobacter baumannii* (35.71%). توزيع *Pseudomonas aeruginosa* في المصالح 04 كان ملحوظًا، بنسبة (33.34%) لوحظت في مصلحة العناية المركزة و مصلحة العظام، أما بالنسبة لمصلحة الجراحة والطب الداخلي فقد كان (11.12%) و (22.23%) على التوالي. تم عزل سلالات *Pseudomonas aeruginosa* التسعة من عينات مرضية مختلفة ، بشكل رئيسي من الجروح (66.67%) ، المسابير البولية وتم العثور على المستوى الأدنى في القسطرة الوريدية المركزية (11.12%).

في الوقت الحالي، يعد الامتثال لشروط النظافة ومراقبة انتشار السلالات متعددة المقاومة أمرًا ضروريًا لتحسين جودة رعاية المرضى.

الكلمات المفتاحية : *P. aeruginosa* , المقاومة , المضادات الحيوية , المستشفى الجامعي لتلمسان

RESUME

Pseudomonas aeruginosa est l'un des agents pathogènes opportunistes, qui se caractérise par sa persistance et sa résistance en milieu hospitalier aux antibiotiques. Dans ce travail, Sur un total de 32 bacilles à Gram négatif (BGN) identifiés provenant du CHU de Tlemcen, 14 souches appartenant au groupe des non fermentaires (BGNNF) avec un taux de 43.75% ont été isolées dont 09 *Pseudomonas aeruginosa* (64.28%) et 05 *Acinetobacter baumannii* (35.71%). La répartition de *Pseudomonas aeruginosa* selon les 4 services a été remarquable, avec un taux de 33.34% observé au niveau du service de réanimation et de traumatologie, pour la chirurgie et service de la médecine interne le taux est de (11.12%) et (22.23%) respectivement. Les 9 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de différents prélèvements pathologiques, essentiellement des plaies (66.67%), des sondes urinaires (22,32%) et le taux minimal a été trouvé dans les cathéters veineux centraux (11.12%).

Actuellement, le respect des conditions d'hygiène et la surveillance de la propagation des souches multi-résistantes est nécessaire pour l'amélioration de la qualité de la prise en charge des patients.

Mots clés : *P. aeruginosa*, résistance, antibiotiques, CHU de Tlemcen.

Summary

Pseudomonas aeruginosa is one of the opportunistic pathogens, which is characterized by its persistence and resistance in the hospital environment to antibiotics. In this work, of a total of 32 Gram-negative bacilli (BGN) identified from the Tlemcen University Hospital, 14 strains belonging to the non-fermentative group (BGNNF) with a rate of 43.75% were isolated, including 09 strain of *Pseudomonas aeruginosa* (64.28%) and 05 *Acinetobacter baumannii* (35.71%). The distribution of *Pseudomonas aeruginosa* according to the 4 services was remarkable, from a rate of (33.34%) was observed in the intensive care and traumatology services, for the surgery and internal medicine services it was (11.12%) and (22.23%) respectively. The 9 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from different pathological samples, mainly from wounds (66.67%), urinary catheters and the minimal level was found in central venous catheters (11.12%). Currently, the respect of hygienic conditions and the monitoring of the spread of multi-resistant strains is necessary to improve the quality of patient care.

Key words: *P. aeruginosa*, resistance, antibiotics, CHU of Tlemcen.

Introduction

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué la plus importante révolution de la médecine qui a sauvé et qui sauve des millions de vies chaque année, mais leur efficacité est menacée car les bactéries peuvent s'adapter et résister au traitement. Ces molécules ont été considérées comme étant des armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne (Ayad, 2017). Toutefois, la résistance aux antibiotiques est apparue rapidement. Les bactéries peuvent être résistantes à un ou à plusieurs antibiotiques on parle alors de bactéries multi-résistantes ou BMR.

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste qui pose de réels problèmes thérapeutiques depuis quelques années (Mérens *et al.*, 2011). Par conséquent, l'augmentation actuelle de l'incidence des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* (PAMR) et les épidémies locales qui en résultent sont particulièrement inquiétants (Barbier et Wolff, 2010).

En raison de son grand nombre de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* peut provoquer une série d'infections aiguës et chroniques en milieu communautaire, mais surtout dans les hôpitaux où il est impliqué dans diverses infections liées aux soins (Ramos *et al.*, 2013). C'est le principal pathogène nosocomial, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation (Barbier et Wolff, 2010). Ce type de bactérie opportuniste se caractérise par un fort potentiel d'adaptation au milieu hospitalier et par la rapidité d'acquisition d'une résistance aux antibiotiques (Mérens *et al.*, 2011). L'émergence de cette bactérie résistante aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique.

Le bacille pyocyanique présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ce qui rend ce pathogène encore plus inquiétant, c'est la prévalence accrue d'isolats multirésistants par rapport au nombre limité de molécules anti-pseudomonas existantes (Nathwani *et al.*, 2014). La résistance peut être intrinsèque, adaptative ou acquise (Gellatly et Hancock, 2013). Elle peut être également due à l'utilisation systématique et à grande échelle d'antibiotiques dans le secteur médical ou agroalimentaire (Sefraoui, 2015).

L'utilisation répétée d'antibiotiques en grande quantité permet d'acquérir de nouveaux modes de résistance, conduisant à l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes et augmentant ainsi le taux de mortalité des personnes infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (Chung *et al.*, 2011; Micek *et al.*, 2011).

Le but de nos travaux est d'étudier la résistance aux antibiotiques de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de l'hôpital universitaire de Tlemcen selon les étapes suivantes:

- Isolement et identification des souches à partir de divers prélèvements de patients provenant de divers services du CHU de Tlemcen ;
- Recherche sur la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques (β -lactamines, aminosides, quinolones et colistines);
- Détecter le phénotype de résistance aux antibiotiques.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en trois parties:

- ❖ La première partie consiste en une synthèse bibliographique présentant le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* et passant en revue les caractéristiques structurales et le mécanisme d'action des antibiotiques les plus couramment utilisés pour traiter les infections causées par ce germe. A la fin de cette partie, le mécanisme de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques a également été introduit.
- ❖ Dans la deuxième partie, nous présenterons les outils méthodologiques utilisés;
- ❖ Enfin, la troisième partie sera consacrée à l'ensemble des résultats obtenus et à la discussion qui en résulte.

PREMIERE PARTIE
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Caractères généraux de *Pseudomonas aeruginosa*

1. Historique-taxonomie

La bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa* est aussi connue sous le nom de bacille pyocyanique en raison du pigment pyocyanique bleu-vert qu'elle produit. Ce dernier a été associé à des organismes en forme de bâtonnet par Lucke en 1862. *P.aeruginosa* a été mentionnée pour la première fois dans la littérature par Schroeter en 1872. En 1882, ce pathogène a été isolé avec succès en culture pure par Carle Gessard (**Hugh et Leifson, 1964**). Cette bactérie à Gram négatif qui se caractérise notamment par la production des pigments de pyocyanine et de pyoverdine ainsi que son odeur aromatique (seringat) est de nature très répandue.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* appartient au règne *Bacteria*, à la division *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordre *Pseudomonadales* et à la famille *Pseudomonadaceae*. Cette dernière renferme 10 genres dont le genre *Pseudomonas* (**Moore et al., 1996 ; Brenner, 2005**).

2. Habitat et distribution environnementale

Pseudomonas aeruginosa est une espèce bactérienne ubiquitaire, retrouvée dans divers environnements (**Lister et al., 2009**). Elle vit à l'état saprophyte dans les eaux (rivières, égouts...), les sols humides et les plantes (**Palleroni, 1984**). Cette bactérie peut également être trouvée dans la poussière en suspension dans l'air, et même dans des solutions antiseptiques (**Terrier et al., 1992; Pirnay et al., 2009**). Elle vit aussi à l'état commensal dans le tube digestif (téguments, intestin) et rarement dans la peau et les muqueuses des humains et des animaux. Ce pathogène opportuniste adopte deux modes de vie: un mode de vie planctonique, où ils se déplace librement dans un milieu liquide et un mode de vie sessile sous forme de biofilm (**Costerton et al., 1995**).

3. Caractères bactériologiques

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif non fermentant (BGNnF) en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de long sur 0.5-0.8µm de diamètre selon la souche. C'est une bactérie dépourvue de spores et de capsules, la majorité des souches sont mobiles grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire ou de structures en forme de pili (**Figure 1**). Des souches immobiles peuvent néanmoins être rencontrées (**Eyquem et al., 2000; Hafiane et Ravaoarino, 2008**).

Ce type de bacille est peu exigeant, il se cultive très facilement sur les milieux de culture conventionnels. C'est une bactérie mésophile, sa température de croissance allant de 4°C et 45°C avec une température optimale se situe entre de 30 et 37°C (Ojeniyi, 1994; Eyquem *et al.*, 2000). Elle peut croître dans un intervalle de pH allant de 4,5 à 9,5.

Bactérie aérobie stricte à métabolisme oxydatif, elle utilise comme accepteur d'électrons l'O₂ mais en absence de ce dernier, elle peut le remplacer par les nitrates ou les nitrites (Van Alst *et al.*, 2009).

Elle produit le plus souvent des pigments caractéristiques tels que la pyoverdine (jaune-vert), le sidérophore impliqué dans la capture du fer, élément essentiel à la croissance et à la prolifération bactérienne et la pyocyanine (bleu-vert) qui peut jouer le rôle d'accepteur terminal d'électrons permettant ainsi à la bactérie de se développer en anaérobiose (Daly *et al.*, 1984).

Le génome de la souche de référence PAO1 a été complètement séquencé en 2000 (Stover *et al.*, 2000). Il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens séquencés, avec 6,26 millions de paires de bases, ce qui représente plus de 5 500 gènes (Stover *et al.*, 2000). D'autres souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été séquencées comme PA14 (Lee *et al.*, 2006), PA7 (Roy *et al.*, 2010), LESB58 (Winstanley *et al.*, 2009), YL84 (Chan *et al.*, 2014). Ce génome est doté d'une grande adaptabilité nutritionnelle (codage de nombreux systèmes dédiés au chimiotactisme), métabolique (catabolisme) ainsi qu'une résistance intrinsèque aux antibiotiques (transport et codage des systèmes d'efflux) ce qui lui permet de se développer même dans des milieux pauvres en nutriments (capacité d'adaptation à divers environnements) (Stover *et al.*, 2000).



Figure 1. *Pseudomonas aeruginosa* observée au microscope électronique (Saffiedine, 2019)

4. Pouvoir pathogène

Ce germe opportuniste peut être considéré comme un pathogène hospitalier majeur et l'un des principaux agents pathogènes nosocomiaux affectant les patients hospitalisés.

Il peut être impliqué dans de nombreuses infections aiguës et chroniques dans la communauté, mais surtout dans les hôpitaux, provoquant 10 à 20% des infections nosocomiales (**Frikh et al., 2017**).

Sa pathogénicité est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, fortement induits chez les individus présentant des défenses immunitaires défaillantes (patients en réanimation, atteints de pneumopathies, immunodéprimés, ...) (**Mahenthiralingam et al., 1996**).

Cet agent pathogène joue un rôle important dans l'infection broncho-pulmonaire chronique provoquant de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (**Al-Aloul et al., 2004**).

Cette bactérie provoque aussi des infections respiratoires, urinaires, une otite externe qui peut être fatale chez les diabétiques. Elle peut également engendrer une kératite ulcéreuse chez les porteurs de lentilles de contact, des infections cutanées, des plaies et des infections secondaires des brûlures (**Lazdunski, 2003; Mesaros et al., 2007**). Elle est capable de causer une méningite et une ostéomyélite en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (**Carek et al., 2001**).

Des septicémies et des bactériémies s'observent chez les malades en état d'immunodéficience en relation avec une infection par le virus HIV, chez les diabétiques ou chez les brûlés (**Sligl et al., 2006**).

Les infections à cette espèce sont une complication classique chez les sujets soumis à une chimiothérapie anticancéreuse et présentant une neutropénie (**Krcmery et al., 2006**).

P. aeruginosa cause rarement de vraies infections du système digestif mais généralement, la colonisation par cette bactérie favorise le développement d'infections invasives chez le patient à risque (**Mesaros et al., 2007**).

En plus, la flore endogène des patients hospitalisés est la principale source de leur contamination, mais l'environnement est également incriminé (**Talon et al., 1995; Bergmans et al., 1998; Minchella et al., 2010**).

5. Facteurs de virulence

La virulence de la bactérie dépend d'un grand nombre de facteurs associés aux cellules membranaires et extracellulaires, ces facteurs jouent un rôle important dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). Ces principaux facteurs sont présentés dans (Tableau 1) et (Figure 2).

Tableau 1. Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011)

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
LPS	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	-Adhésion aux mucines -Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	-Provoque le phénotype muqueux -Adhésion aux cellules trachéales -Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	-Pathogénicité respiratoire. -Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux antibiotiques. -Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules cible	-Mort cellulaire : nécrose tissulaire -Rôle important dans la virulence
Exoenzyme S	-Effet cytotoxique -Prolifération des lymphocytes T	-Nécrose tissulaire -Entraîne des lésions du Glycopéptide, de la vimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	-Lésions des cellules épithéliales et responsable de bactériémie voire de choc septique
Rhamnolipide	Effet detergent	Hydrolyse du surfactant

Synthèse bibliographique

Elastase (LasA LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	-Destruction des tissus contenant de l'élastine -Rôle important dans la virulence
Protease alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes
Pyocyanine + Pyoverdine	-Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'Elastase. -Inhibition des battements des cils et captage du fer. -Induisent la synthèse de radicaux libres.	-Favorise l'émergence du bacille pyocyanique -Diminution de la clairance des bacilles -Rôle dans la survenue de vascularité d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	-Pathogénicité respiratoire -Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	-Lyse des cellules cibles (atélectasie pulmonaire) -Rôle dans l'infection aiguë et chronique.

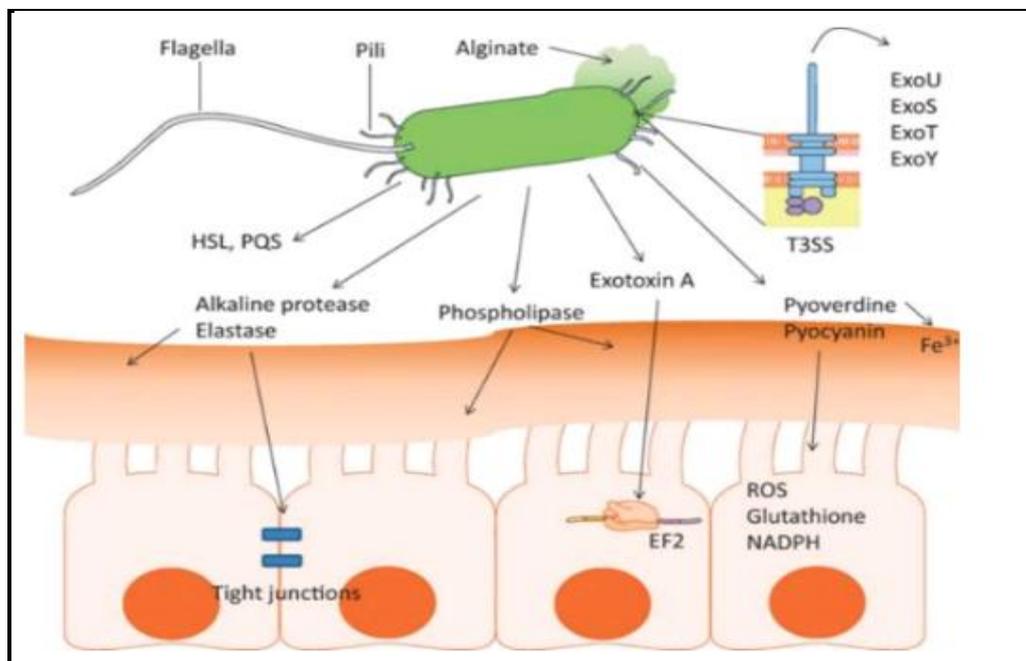


Figure 2. Les principaux facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Gellatly et Hancock, 2013)

Chapitre II : Antibiotiques

Les antibiotiques sont l'une des découvertes les plus importantes du 20^e siècle. Les premiers étaient le sulfamide développé en 1935 puis la pénicilline après la Seconde Guerre mondiale (**Klimek *et al.*, 1946**). C'est Alexander Fleming qui a décrit ses propriétés antibiotiques en 1929. Un grand nombre d'ATB (antibiotiques) sont des substances naturelles produites par des bactéries ou des champignons respectivement qualifiés de bactéricides (= capacité à tuer les bactéries) ou bactériostatiques (= capacité à limiter la croissance des bactéries) (**Avril et Tardivel, 1996**). Ce terme désigne aussi toute molécule chimique élaborée par des microorganismes capable d'inhiber le développement ou de détruire d'autres microorganismes (**Courvalin *et al.*, 2001**). Plus tard, le développement de la synthèse chimique permettra de diversifier les molécules à activité antibiotique en créant des molécules totalement nouvelles ou des molécules «semi-synthétiques» à partir de substances naturelles existantes (**Nauciel et Vildé, 2005**). Ils seront donc utilisés pour lutter contre les maladies infectieuses (tuberculose, pneumonie, diphtérie, syphilis, tétanos, etc.) (**Walsh, 2003**). Aujourd'hui, il existe plus d'une dizaine de familles d'antibiotiques.

1. β -lactamines

Ces ATBs sont les plus utilisés en thérapie en raison de leur large spectre d'activité, leur action bactéricide rapide sur les bactéries sensibles et à l'extrême diversité de leurs structures (**Philippon, 2008; Robin *et al.*, 2012**). Ils ciblent les PLPs (Protéines Liant la Pénicilline), enzymes nécessaires à la synthèse du peptidoglycane (**Vettoretti, 2009**).

1.1. Structure et classification

Cette vaste famille comprend toutes les molécules comprenant un noyau β -lactame (**Figure 3**) composé de trois carbones et un atome d'azote. Ce noyau est commun à toutes les bêta-lactamines (**Bryskier, 1999**). A partir de cette structure, cinq groupes ont été développés en ajoutant un cycle latéral: les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de la β -lactamase (**Cavallo *et al.*, 2004**).

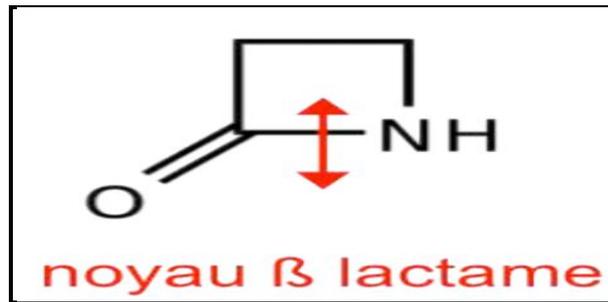


Figure 3. Le noyau de β -lactame (Monlezun, 2012)

A. Les pénicillines (Pénames)

Elles ont un cycle thiazolidine (5 côtés) attaché au noyau β -lactame (Figure 4).

Il existe plusieurs sous-classes selon la nature de leur chaîne latérale dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) uréidopénicillines (pipéracilline) et amidinopénicillines (pivmécillinam) (Ruppé, 2010).

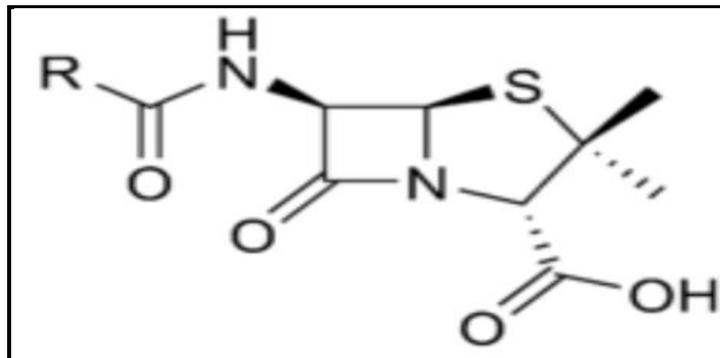


Figure 4. Structure générale d'une pénicilline

B. Les céphalosporines (Céphèmes)

Le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine distingue chimiquement les céphalosporines par rapport aux pénicillines (Figure 5). Il existe quatre générations de céphalosporines. Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, ce qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés (Toure, 2004).

- ✓ Les céphalosporines de première génération (C1G) : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif et ont un spectre d'action limité aux cocci à Gram positif et à quelques bacilles à Gram négatif qui ne produisent pas de céphalosporinase. Ces molécules sont en revanche facilement dégradées par les β -lactamases

(Bryskier, 1999). Il y avait plus de dix céphalosporines dites de première génération mais certaines ne sont plus commercialisées. Exemples: céfalotine, céfazoline et céfalexine.

- ✓ Les céphalosporines de deuxième génération (C2G) : elles se caractérisent par un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif, une meilleure résistance aux β -lactamases, une activité à faible concentration, une bonne diffusion tissulaire (Allain, 2008). Exemples : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan;
- ✓ Les céphalosporines de troisième génération (C3G) : leur spectre s'étend à la plupart des entérobactéries. Par exemple: Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone et Céfopérazone (Toure, 2004).
- ✓ Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries qui ont acquis une résistance au C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et céfpirome (Ruppé, 2010).

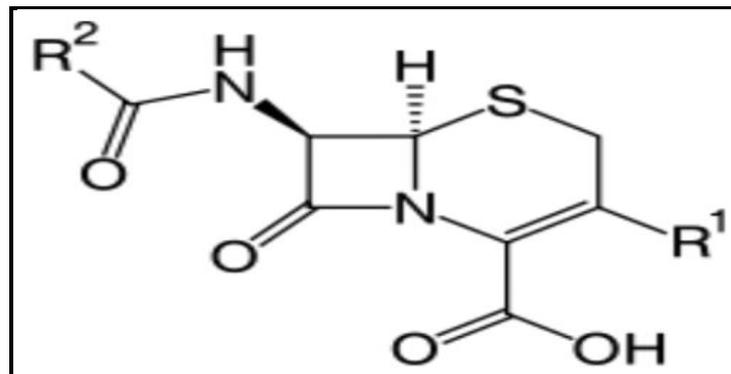


Figure 5. Structure générale d'une céphalosporine

C. Les carbapénèmes(Pénèmes)

Les carbapénèmes sont les agents antibactériens les plus stables de la famille des β -lactames et sont moins sensibles à l'hydrolyse par les β -lactamases. Les pénèmes sont caractérisés par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé lié au cycle β -lactame (Figure 6(a)).

Les carbapénèmes ont été considérées comme le traitement de choix des infections graves par des bactéries à Gram négatif (Kattan *et al.*, 2008).

Depuis, un groupe méthyle en position C1 a été ajouté aux carbapénèmes de nouvelle génération (Figure 6(b)) (imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème) (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

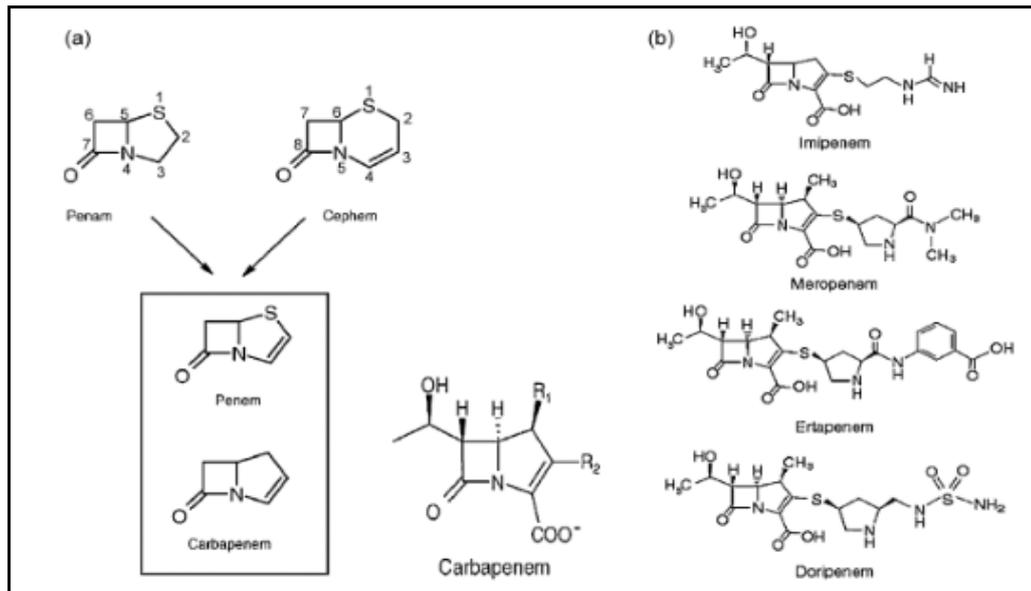


Figure 6. (a) Structure générale et (b) Structures chimiques de différentes carbapénèmes

D. Les Monobactames

Sont des β -lactamines monocycliques inactives sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies (Figure 7). L'aztréonam est le seul monobactame sur le marché (Ruppé, 2010). Il présente une très bonne activité contre les bactéries aérobies à Gram négatif et plus particulièrement contre les entérobactéries, pour lesquelles il a une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β lactamases (Cavallo *et al.*, 2004).

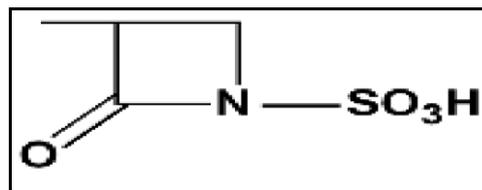


Figure 7. Structure générale des monobactames

E. Les inhibiteurs de β -lactamases

Ce sont l'acide clavulanique (clavame ou oxapénème), le sulbactam et le tazobactam (pénicilline sulfone) (Figure 8). Ils ont une faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une β -lactamine, ils rétablissent l'activité antibactérienne qu'il n'avait plus du fait de son hydrolyse par les β -lactamases. Il en résulte une action synergique et une augmentation de l'activité de la β -lactamine (Cavallo *et al.*, 2004). Les associations suivantes sont actuellement disponibles:

- amoxicilline-acide clavulanique (Augmentin)
- pipéracilline-tazobactam (Tazocillin)
- Ticarcilline-acide clavulanique (Claventin)

Le spectre d'inhibition de ces molécules est limité aux pénicillinases (**Ruppé, 2010**).

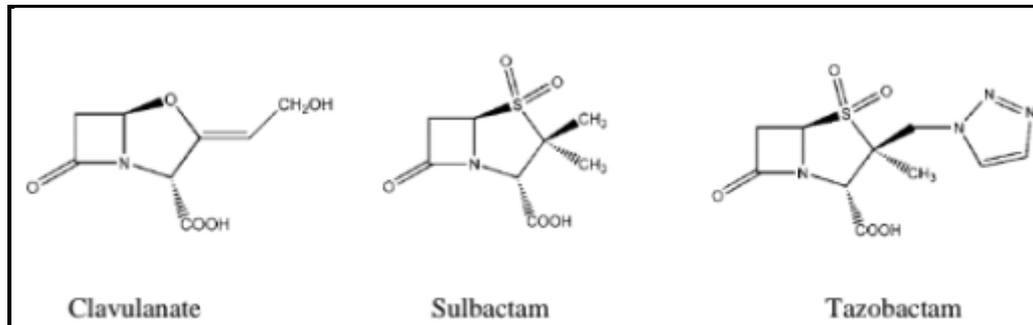


Figure 8. Les différentes structures des inhibiteurs de β -lactamases (**Cavallo et al., 2004**).

1.2. Mécanisme d'action

Les β -lactames agissent en inhibant la synthèse du peptidoglycane en bloquant l'action des enzymes appelées PLPs localisées dans l'espace périplasmique (**Cavallo et al., 2004**). Cet élément est composé d'une partie glucidique ("NAM" et "NAG") et d'une partie peptidique composée de 5 acides aminés (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) (**Monlezun, 2012**). Sa synthèse implique trois types d'enzymes appartenant à la famille des PLPs: la transglycosylase, la transpeptidase et la carboxypeptidase (**Philippon, 2008**). Ces molécules sont des analogues de la D-alanyl-D-alanine, l'acide aminé terminal du précurseur peptidique du peptidoglycane (**Livermore, 1995**). Cette similarité structurale leur permet ainsi de se lier de façon irréversible sur le site actif des PLPs qui ne peuvent pas réaliser la dernière étape de transpeptidation et la transglycosylation bactériostatique (**Tankovic, 2000**) et elle provoque un effet bactéricide (**Bonnet, 2006**).

2. Aminosides

Les aminosides forment une famille d'antibiotiques connue depuis 1944, année de la découverte de la streptomycine (**Bryskier, 1999**). De par leur spectre d'activité étendu et leur caractère rapidement bactéricide, les aminosides occupent une place importante dans le traitement des infections à Gram négatif (**Hermann, 2007**).

2.1. Structure et classification

Chimiquement, les aminosides sont des polycations hydrophiles composés, dans la majorité des cas, de plusieurs cycles glycosidiques et d'un cycle aminocyclitol (2-déoxystreptamine) substitué en position 4,5 ou 4,6 (**Figure 9**) (**Magnet et Blanchard, 2005**).

Les 2-déoxystreptamines regroupent la plupart des composés utilisés en thérapeutique humaine comme : la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine (**Nguyen et Lambert, 2012**).

Les composés contenant le cycle DOS sont classés en sous-familles selon la substitution de ce cycle. On distingue ainsi (**Jana et Deb, 2006**):

- Les 2-déoxystreptamines monosubstituées en 4^{ème} position : Néamine
- Les 2-déoxystreptamines monosubstituées en position 5 : Hygromycine B
- Les 2-déoxystreptamines bisubstituées en position 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS) : Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine.
- Les 2-déoxystreptamines bisubstituées en 4^{ème} et 6^{ème} position (groupe 4,6-2-DOS) : Kanamycines A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibékacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine (**Jana et Deb, 2006**).

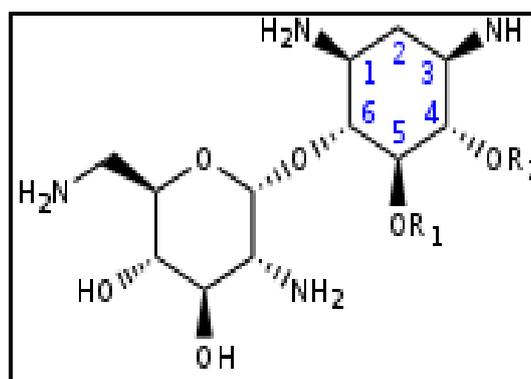


Figure 9. Structure générale d'un aminoside

2.2. Mécanisme d'action

Leur action antibactérienne commence par la pénétration dans le cytoplasme bactérien (**Magnet et Blanchard, 2005**). Leur action s'exerce via la liaison, par leurs fonctions $-OH$ et $-NH_2$, à la sous-unité 30S des ribosomes et plus particulièrement au niveau du site A de l'ARN ribosomique 16S (Acide ribonucléique) (**Durante et al., 2009**). Cette liaison inhibe la

traduction et peut aussi causer une mauvaise interprétation du code génétique. Les aminosides peuvent en outre, s'accumuler de façon irréversible dans la cellule bactérienne, altérer la synthèse de l'ADN bactérien (Acide désoxyribonucléique) ou dégrader l'ARN ou encore provoquer des désordres ioniques importants dans la cellule bactérienne (Ayad, 2017).

3. Les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones dérivent des quinolones, d'où l'appellation « quinolones de deuxième génération ». Ce sont des antibiotiques synthétiques, qui ont tous un atome de fluor. En empêchant la réplication de l'ADN, ils ont une activité bactéricide utilisée en pratique clinique depuis les années 1980.

Ce sont des composés qui couvrent presque tous les agents pathogènes connus, avec une diffusion tissulaire et intracellulaire remarquable. Ainsi les fluoroquinolones sont une alternative intéressante, notamment pour lutter contre les organismes résistants aux autres antibiotiques tels que les macrolides ou les pénicillines (Cazes, 2017).

3.1. Structure et classification

Sa structure chimique présente une structure bicyclique, un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 (Soussy, 2006) (Figure 10).

Les quinolones sont classées en 4 générations :

- ✓ Les quinolones de la première génération sont : l'acide nalidixique, cinoxacine.
- ✓ Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones : norfloxacin, ofloxacin et ciprofloxacine.
- ✓ Les quinolones de troisième génération : sparfloxacin, gatifloxacin et Grepafloxacin.
- ✓ Les quinolones de quatrième génération : trovafloxacin, moxifloxacin et gemifloxacin (Redgrave et al, 2014).

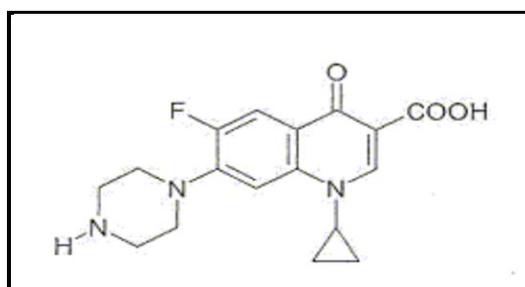


Figure 10. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine

3.2. Mécanisme d'action

Les fluoroquinolones agissent en inhibant la réplication de l'ADN bactérien. Elles ont pour cible les topoisomérase de type II (gyrase) : l'ADN gyrase cible principale chez les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV, la principale cible des bactéries à Gram positif. Ces deux enzymes sont constituées de deux sous-unités sous la forme d'un dimère, dont la sous-unité A est responsable de l'activité catalytique (GyrA de l'ADN gyrase et ParC de la topoisomérase IV) et la sous-unité B pour la production d'énergie par hydrolyse de l'ATP (GyrB pour l'ADN gyrase et ParE pour la topoisomérase IV). L'ADN gyrase permet le superenroulement négatif de la molécule d'ADN au moment de la réplication. La topoisomérase IV est particulièrement impliquée dans la décaténation des chromosomes fils en fin de réplication. Les fluoroquinolones, se fixant au niveau des complexes ADN gyrase et topoisomérase IV, en bloquent la progression de la fourche de réplication de l'ADN et aboutissent ainsi à la mort bactérienne (**Chidiac, 2015**).

4. Colistine

La polymyxine forme une famille d'oligopeptides cycliques antibactériens synthétisés par les bactéries à Gram positif, *Bacillus polymyxa*. L'effet bactéricide des polymyxines est obtenu par action au niveau de la membrane cytoplasmique (**Lee et al., 2014**). Bien qu'ayant une activité intrinsèque intéressante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, cet antibiotique est peu utilisé en thérapeutique humaine en raison de sa néphrotoxicité (**Falagas et al , 2005**). Cinq classes chimiques sont décrites (A, B, C, D et E), mais seuls deux composés sont utilisés pour le traitement: la polymyxine B et la polymyxine E (ou colistine). La polymyxine E diffère de la polymyxine B par un seul acide aminé en position 6, où la D-phénylalanine de la polymyxine B est remplacée par une D-leucine chez la colistine (**Dortet et al, 2016**) (**Figure 11**).

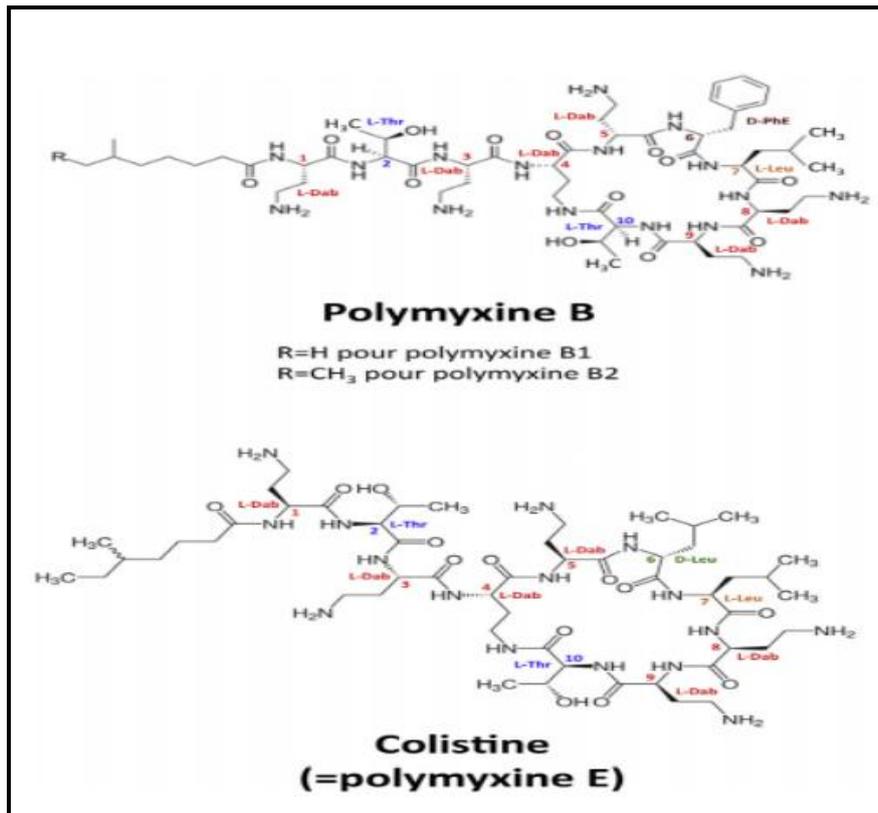


Figure 11. Structure chimique de la polymyxine B et de la colistine. L-Dab : acide L-2,4-Diaminobutyriques ; L-Thr : L-Thréonine ; L-Phe : L-Phénylalanine ; L-Leu : L-Leucine ; D-Leu : D-Leucine (**Dortet et al , 2016**)

4.1. Mécanisme d'action

La cible de la polymyxine est le lipopolysaccharide bactérien (LPS), qui est un composant de la membrane externe des bacilles à Gram négatif (**Dortet et al , 2016**). L'interaction électrostatique entre les résidus acide α , γ -diaminobutyrique (Dab) chargés positivement de polymyxine et le groupe phosphate chargé négativement du lipide du LPS, provoque un déplacement des ions divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) et ainsi une déstabilisation du LPS. Les extrémités hydrophobes des polymyxines interagissent ensuite avec le LPS, ce qui leur permet de s'insérer dans la membrane externe. Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite du contenu intracellulaire conduisant à la lyse bactérienne et à la mort cellulaire (**Jayol, 2018**).

5. Les sulfamides

Ils sont constitués d'un noyau paraminobenzène sulfonamide avec un radical R, qui détermine leur pharmacocinétique et leur classification pratique en fonction de leur durée d'action et / ou de leur site d'action (Yala *et al.*, 2001).

5.1. Mécanisme d'action

Ils ont une activité bactériostatique. Ils rivalisent avec le PAB et bloquent ainsi l'effet de la synthétase (Figure 12) (Yala *et al.*, 2001).

6. Le Triméthoprim

C'est un inhibiteur des folates. Il appartient à la famille des diaminopyrimidines qui sont des antibactériens et des antiparasitaires (Yala *et al.*, 2001).

6.1. Mécanisme d'action

Le Triméthoprim agit dans le blocage enzymatique de la synthèse des folates, juste après les sulfamides (Yala *et al.*, 2001)(Figure 12).

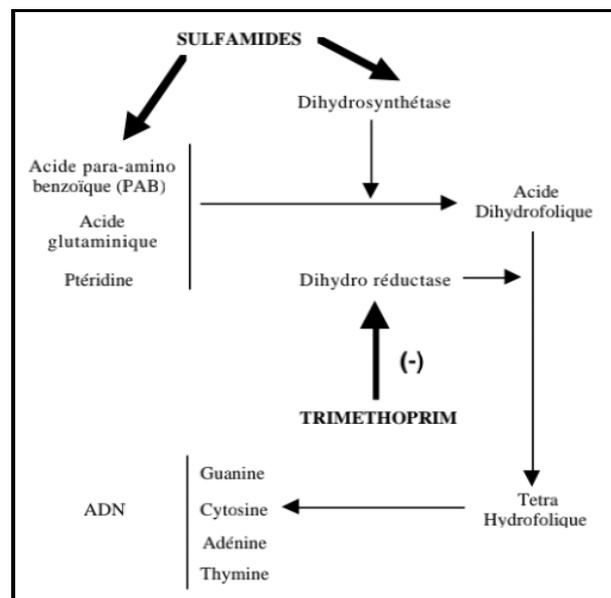


Figure 12. Mécanisme d'action des Sulfamides et Triméthoprim

Chapitre III : Mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

1. Résistance aux β -lactamines

1.1. Résistance naturelle

P. aeruginosa possède une membrane externe faiblement perméable, ce qui lui confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* produit une β -lactamase chromosomique inductible de classe « C » qui n'est pas inhibée par le clavulanate et qui hydrolyse préférentiellement les céphalosporines de 1^{ère} génération. Lorsque les β -lactamases sont produites, les antibiotiques ne peuvent donc plus jouer leur rôle mimétique du dipeptide D-Ala-D-Ala auprès de la transpeptidase et la survie de la bactérie est ainsi assurée (**Monlezun, 2012**).

Malgré la faible perméabilité membranaire, certains antibiotiques parviennent à franchir la membrane externe (**Nikaido, 1998**). Les bactéries ont donc développé d'autres mécanismes afin de diminuer la concentration intracellulaire d'antibiotiques. Il s'agit des pompes d'efflux qui correspondent à des canaux actifs permettant d'expulser les molécules nocives vers le milieu extracellulaire (**Schweizer, 2003**). Ces pompes d'efflux appartiennent à la famille des RND (Resistance Nodulation cell Division). La pompe la plus fréquemment rencontrée chez *P. aeruginosa* est de type MexAB-OprM (**Vedel, 2005**).

Pseudomonas aeruginosa naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, aux céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{ème} génération, la plupart des céphalosporines de 3^{ème} génération, aux quinolones de première génération et à la kanamycine (**Touati, 2013**).

1.2. Résistance acquise

P. aeruginosa est probablement l'espèce bactérienne pathogène présentant la diversité la plus large en termes de β -lactamases acquises. Ces enzymes sont quasi exclusivement codées par des plasmides (**Barbier et Wolff, 2010**). L'acquisition de résistances aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* résulte de mutations entraînant une surproduction de la céphalosporinase constitutive AmpC, une surexpression des systèmes d'efflux actif, une diminution de perméabilité membranaire et l'acquisition de gènes exogènes. La dissémination de β -lactamases à spectre étendu, de métallobetalactamases et d'oxacillinases à spectre élargi est un phénomène émergent que le biologiste doit pouvoir rapidement évoquer (**Mérens et al, 2011**).

1.2.1. Mécanisme enzymatique

La bactérie possède la capacité de synthétiser certaines enzymes susceptibles d'inactiver les antibiotiques telles que les bêta-lactamases capables de dégrader les bêta-lactamines (**Lambert, 2002; Lister et al., 2009**). Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation, elles sont groupées en quatre classes de A à D selon la classification d'Ambler en fonction de leur structure primaire (**Baba Ahmed et Arlet, 2014**). Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active. Tandis que les enzymes appartenant à la classe B (métallo-lactamases) possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le zinc (**Aggoune, 2009**).

✓ Résistance par production de β -lactamases de classe A

Dans la classe A, on distingue les pénicillinases et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les pénicillinases, les enzymes rencontrées le plus c'est les enzymes PSE (*Pseudomonas* Specific Enzyme). Quatre enzymes PSE ont été décrites chez *P. aeruginosa* : PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 et CARB-4 (**Bert et al., 2002**). PSE-1, PSE-4 et CARB-3, ces enzymes sont étroitement liées (la différence est 1 ou 2 acides aminés), par contre CARB-4 ne présentent que 86,3% d'homologie (**Strateva et Yordanov, 2009**). Elles sont actives contre les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et la cefsulodine mais inefficaces vis-à-vis des céphalosporines, des carbapénèmes ou de l'aztréonam (**Bert et al., 2002**). Elles sont inactivées par les inhibiteurs classiques des β -lactamases (**Monlezun, 2012**).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes apparues à la suite des mutations des pénicillinases. Le gène codant pour ces BLSEs est localisé principalement sur des plasmides, d'éléments génétiques mobiles et des transposons, ce qui explique le taux de sa diffusion. Les BLSEs hydrolysent non seulement la carboxypénicillines et la uréidopénicillines mais aussi les céphalosporines (ceftazidime, céfépime) (**Weldhagen et al., 2003**). Ces enzymes confèrent une résistance à la quasi-totalité des β -lactamines, excepte les céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et les carbapénèmes, et elles sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam (**Baba Ahmed et Arlet, 2014**).

Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa*. Plusieurs souches de *P. aeruginosa* productrices de TEM ont été isolées en France entre 1992 et 1998: TEM-42, TEM-4, TEM-21 et TEM-24 (**Mugnier et al., 1996**;

Poirel et al., 1999; Marchandin et al., 2000; Dubois et al., 2002a). Ces BLSEs ont un spectre d'activité similaire à celui des enzymes classiques, à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (C3G et Aztréonam). D'autres types de BLSEs de classe A d'Ambler ont été rapportés. Les BLSEs de type BEL (Belgium) ont été rapportées dans une étude multicentrique entre 2004 et 2008 en Belgique (**Glupczynski et al., 2010**).

✓ **Résistance par production de β -lactamases de classe B**

Ces enzymes sont connues sous le nom de carbapénémases ou Métallo- β -lactamase (MBLs), en raison de la présence d'un ou deux atome(s) de zinc dans leur site actif. Ces dernières (les métallo-enzymes) confèrent la résistance à la plupart des β -lactamines existantes en plus de la résistance aux carbapénèmes, sauf l'aztréonam. L'activité de ces métallo- β -lactamases n'est pas inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam mais par des chélateurs d'ions divalents tels que l'EDTA (**Nordmann et Poirel, 2002; Strateva et Yordanov, 2009**). La recherche de métallo- β -lactamases est justifiée devant une souche résistante à la ceftazidime et à l'imipénème (**Monlezun, 2012**). Les MBLs les plus détectés chez *P. aeruginosa* sont les (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM, et NDM) (**Sefraoui et al., 2014**). Les types IMP et VIM demeurent les MBLs les plus rapportées dans le bassin méditerranéen chez *P. aeruginosa* (**Sefraoui et al., 2014 ; Mathlouthi et al. 2015**).

✓ **hyperproduction de la céphalosporinase AmpC**

Pseudomonas aeruginosa est naturellement susceptible aux carboxypénicillines, à la ceftazidime et à l'aztréonam, cependant il peut acquérir une résistance aux céphalosporines de troisième génération grâce à l'hyperproduction de sa céphalosporinase naturelle, AmpC (**Bagge et al., 2002**). Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Ambler. Ces β -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases (**Rodriguez et Struelens, 2006**). Le mécanisme le plus fréquent est une hyperproduction constitutive de l'AmpC. Des mutations dans le système de régulation de la production entraînent une production stable à haut niveau d'AmpC (**Bouguenoun, 2017**). Ces mutations peuvent toucher le gène ampC lui-même ou les gènes qui rentrent dans sa régulation en induisant une résistance à toutes les β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes (**Sefraoui, 2015**). Actuellement, la surproduction de céphalosporinases constitue le mécanisme de résistance à la ceftazidime le plus fréquemment retrouvé chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées dans divers pays de la Méditerranée (**Garcia-Rodriguez et Jones, 2002; Kalai et al., 2004; Dubois et al., 2008; Drissi et al., 2008; El-Mahdy, 2013**).

✓ Résistance par production de β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D sont appelées « oxacillines à spectre élargi » (ES-OXA). La majorité de ces BLSEs dérivent d'« oxacillines à spectre restreint », OXA-2 (OXA-15 et OXA-32) et de l'OXA-10 (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19 et -28) par des mutations ponctuelles (Poirel *et al.*, 2001a).

OXA-1, OXA-2, OXA-10, oxacillines dites « classiques », sont actives contre les carboxypénicillines et les uréidopénicillines mais inefficaces sur la ceftazidime (Bert *et al.*, 2002). Les oxacillines hydrolysant la ceftazidime ont un spectre d'action incluant le céfotaxime, la céfépime ou l'aztréonam (Bradford, 2001). Les BLSEs de classe D sont actives sur l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. A l'exception d'OXA-18, elle est la seule β -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifié chez *P. aeruginosa* (Poirel *et al.*, 2001a).

1.2.2. Mécanisme non enzymatique

✓ Perte de la porine OprD

Les β -lactamines doivent franchir la membrane externe grâce à des canaux protéiques transmembranaires appelés porines. Les porines bactériennes sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif (Pagès, 2004). Les carbapénèmes présentent la particularité d'utiliser un canal spécifique nommé OprD (*outer membrane protein D*), contrairement aux autres β -lactamines qui empruntent la voie de la porine OprF (*outer membrane protein F*) (Mérens *et al.*, 2011).

Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* reste l'imperméabilité par mutation inactivatrices d'oprD, gène codant la protéine D2 (Barbier et Wolff, 2010). De nombreuses mutations retrouvées dans les souches cliniques entraînent la perte d'OprD et conduisent à une augmentation de 4 à 16 fois de la résistance aux carbapénèmes alors que la CMI des autres β -lactamines reste inchangée. Cependant seule la résistance à l'imipénème est exclusivement dépendante du niveau de production d'OprD. Ainsi on trouve certains mutants qui sont résistants à l'imipénème mais sensibles au mérépénème et au doripénème, mais n'affecte pas l'activité des autres β -lactamines (Pai *et al.*, 2001; Sakyo *et al.*, 2006; Barbier et Wolff, 2010). La résistance liée à l'OprD a été récemment rapporté en Algérie par Safraoui *et al.* (Safraoui *et al.*, 2014).

✓ Pompe à efflux

Chez les bactéries à Gram négatif, les 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. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND (Resistance Nodulation Division) (**Cattoir, 2004**).

Les pompes d'efflux qui ont été décrites chez *P. aeruginosa* sont (MexAB-OprM ; MexCD-OprJ ; MexEF-OprN et MexXY-OprM). Ces pompes confèrent une résistance aux β -lactamines (**Poole, 2011**). Si les pompes MexAB-OprM et MexXY / OprM sont impliquées dans la résistance naturelle de cette bactérie, elles contribuent à augmenter sa résistance à de nombreux antibiotiques en cas de surproduction.

De nombreuses souches cliniques surproduisant l'une ou l'autre ou les deux pompes ont été caractérisées (**Lianes et al., 2004; Hocquet et al., 2007**). Ce phénomène correspond en général à des mutations spontanées au niveau des gènes régulateurs de ces systèmes (**Saito et al., 1999**). Par rapport aux souches sauvages, un mutant surproducteur de la pompe MexAB-OprM va présenter une résistance accrue vis-à-vis des β -lactamines notamment la ticarcilline, le céfotaxime et l'aztréonam mais également vis-à-vis des fluoroquinolones (ofloxacin, ciprofloxacine, lévofloxacine). La surproduction de MexAB-OprM confère une diminution de la sensibilité, voire une résistance à la plus large gamme de β -lactamines, chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie (**Drissi et al., 2008**).

2. Résistance aux aminosides

Comme de nombreuses autres bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* peut acquérir des gènes de résistance aux aminosides véhiculés par des plasmides. Ces antibiotiques agissent en se liant au site aminoacyl (site A) de l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines. Les enzymes-modifiant les aminosides (AME) sont le plus important mécanisme de résistance aux aminosides (**Baba Ahmed et Arlet, 2014**). Les AME sont des enzymes stéréospécifiques qui attachent des groupements phosphate, adényl ou acétyl sur les fonctions $-NH_2$ ou $-OH$ de ces antibiotiques empêchant ainsi leur fixation sur le ribosome (**Monlezun, 2012**).

Trois classes d'enzymes ont été décrites, à savoir les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-o-nucléotidyl transférases (ANT) et les aminosides-o-phosphotransférases (APH). Leurs gènes étant fréquemment portés par des transposons et/ou

des intégrons et induisent une expression constitutive des enzymes à l'origine d'une résistance de haut niveau aux aminosides (**Mérens et al, 2011**).

La plus fréquente dans cette classe d'enzymes modificatrices des aminosides est ANT(2'). Elle inactive la gentamicine et la tobramycine (**Poole, 2005**). On trouve ensuite dans les isolats cliniques ANT(4'), qui confère une résistance à l'amikacine et à la tobramycine. Une troisième nucléotidyltransférase est décrite chez *Pseudomonas aeruginosa*, elle est active sur la streptomycine mais est inefficace sur les aminosides utilisés en milieu clinique contre le bacille pyocyanique (**Ramirez et Tolmasky, 2010**). Les acétyltransférases les plus communes sont : AAC(3) et AAC(6') et sont toutes deux divisées en sous familles. La sous-famille AAC(3)-I qui comporte trois variants chez *Pseudomonas aeruginosa* est un déterminant classique de la résistance à la gentamicine de cet organisme. De la même façon, parmi les AAC(6'), AAC(6')-II sert de déterminant pour la résistance à la gentamicine, nétilmicine et à la tobramycine alors que l'AAC(6')-Ib agit préférentiellement sur l'amikacine et à la tobramycine (**Poole, 2005; Ramirez et Tolmasky, 2010**). La production simultanée chez une même bactérie de ANT(2'')-1 et de AAC(6')-Ib se traduit par une résistance à tous les aminosides disponibles (tobramycine, amikacine, nétilmicine et gentamicine) (**Mérens et al, 2011**).

Les principales APH retrouvées chez *Pseudomonas aeruginosa* agissent sur le 3'-OH de leur cible conférant ainsi généralement une résistance aux aminosides non utilisés en thérapeutique (kanamycine, néomycine, streptomycine) (**Poole, 2005**). A cette famille appartient notamment, l'APH(3')-IIb qui, par sa présence dans le génome, est responsable de l'insensibilité générale à la kanamycine du bacille pyocyanique. D'autres APH(3') conférant une résistance vis à vis d'autres aminosides ont été décrites chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit par exemple de APH(3')-VI pour l'amikacine et de l'APH(2'') pour la gentamicine et la tobramycine (**Monlezun, 2012**).

Plus récemment, l'émergence d'un nouveau mécanisme de résistance a été marquée chez les bacilles à Gram négatif, capable de modifier non pas l'aminoside mais la structure ribosomale sur lequel il se fixe, l'ARN 16S. Le gène RmtA (Resistance methylase transferase) a été rapporté chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* au Japon en 2003 (**Yokoyama et al., 2003**).

3. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones (FQ) sont des antibiotiques de synthèse dont les cibles d'action sont les topoisomérases II (ADN gyrase) et topoisomérase IV, deux enzymes impliquées dans la transcription et la réplication de l'ADN bactérien (**Baba Ahmed et Arlet, 2014**). Ces deux enzymes cibles des fluoroquinolones, sont composées de deux sous unités, respectivement : GyrA et GyrB, et ParC et ParE.

Les FQ en particulier la ciprofloxacine, sont couramment utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* (**Poole, 2011**). La résistance à la ciprofloxacine dans cette espèce est exclusivement chromosomique (**Barbier et Wolff, 2010**).

La résistance aux fluoroquinolones chez *Pseudomonas aeruginosa* est due à des mutations dans les Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR) des gènes cibles et à la surexpression de pompes d'efflux (**Monlezun, 2012**). La modification de la cible principale des fluoroquinolones (ADN gyrase, également connue sous le nom de topoisomérase II) se produit par des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA/gyrB* au sein du motif QRDR qui est considéré comme le site actif de l'enzyme (**Strateva et Yordanov, 2009**). Des mutations dans les QRDR des gènes correspondants affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles (**Jacoby, 2005**).

Quatre systèmes d'efflux ont été largement décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY/OprM. Bien que chacun présente un pool préférentiel d'antibiotiques substrats (**Strateva et Yordanov, 2009**), les fluoroquinolones peuvent être prises en charge par toutes ces pompes. En absence de mutation cible, la surexpression des systèmes d'efflux n'est responsable que d'une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones. Le niveau élevé de résistance du bacille pyocyanique pour cette classe d'antibiotiques résultera donc de l'action conjointe des différentes pompes d'efflux causée par les mutations *nalB*, *nfxB* et *nfxC* associée aux mutations sur les enzymes cibles (**Jalal et al., 2000; Le Thomas et al., 2001; Higgins et al., 2003**).

4. La résistance à la colistine

Les polymyxines (polymyxine B et colistine) sont des antibiotiques polycationiques bactéricides actifs sur la plupart des bacilles à Gram négatif dont *P. aeruginosa*.

Le bacille pyocyanique parvient à modifier la composition de sa membrane externe de façon à la rendre imperméable, par une modification déterminée de la composante lipidique A du LPS (**Mérens *et al.*, 2011**), entraînant une réduction de la charge négative nette de la membrane externe (**Lee *et al.*, 2014**). Ceci peut être obtenu, soit par des mutations, soit par l'activation de systèmes membranaires complexes appelés « systèmes de régulation à deux composants » tels que ParRS (**Mérens *et al.*, 2011**). Avec l'utilisation accrue des polymyxines, l'émergence d'isolats de *P. aeruginosa* résistants à la polymyxine a été signalée dans le monde entier (**Lee *et al.*, 2014**).

DEUXIEME PARTIE
MATERIELS ET
METHODES

1. Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau du CHU de Tlemcen institution publique de 800 lits distribués sur 25 services. Les prélèvements sont pratiqués dans différents services. Ces prélèvements sont acheminés au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

2. Prélèvements

Durant la période d'étude allant de Février à Mars 2020, au niveau des services de réanimation, de traumatologie, de chirurgie et Médecine interne. 33 isolats ont été prélevés chez des patients hospitalisés plus de 48h dans ces services.

Les différents prélèvements sont effectués à partir de divers sites sur patients hospitalisés (sondes urinaire, aspiration trachéale, cathéter veineux central, plaie) (**Tableau 2**). Les dispositifs médicaux sont collectés de façon aseptique et placés individuellement dans des tubes en verre stériles puis rapidement transportés vers le laboratoire, pour être incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures dans un bouillon cœur cerveau « BHIB ».

Tableau 2. Répartition des prélèvements selon les types de prélèvements

Type des prélèvements					
Sonde urinaire	Aspiration trachéale	Cathéter veineux central	Plaie	Urine	Total
10	04	01	17	01	33

3. Isolement et purification

L'ensemencement des souches a été réalisé sur milieu Mac Conkey (BioRad) et incubé à 37°C pendant 24 heures. L'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est réalisé sur milieu gélosé additionné au cétrimide à 37 °C pendant 24 heures. La purification des colonies bactériennes est procédée par repiquage successif sur le même milieu.

4. Identification

L'identification bactérienne est réalisée par les méthodes conventionnelles de microbiologie :

4.1. Examen macroscopique des cultures

Après incubation, le premier critère d'identification sur lequel on se base est celle de l'aspect macroscopique des colonies vu à l'œil nue, que ça soit taille, forme du relief (bombée, semi-bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux...), odeur, transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

4.2. Etude des caractères biochimiques

4.2.1. Test d'oxydase

✓ Principe

Test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries à Gram négatif qui produisent cette enzyme, telles que *Neisseria* ou *Pseudomonas*.

✓ Technique

La recherche de l'oxydase peut se faire selon plusieurs méthodes. L'une des plus couramment utilisée consiste à placer un disque d'oxydase sur une lame. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Prélever 1 à 2 colonies pures. Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration.

✓ Lecture

La réaction d'oxydation se traduit par une coloration violette foncée en deux minutes environ.

4.2.2. Galerie API 20E

API 20 E (bioMérieux) est un système miniaturisé et standardisé des techniques biochimiques classiques, destiné pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Comprenant 21 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, lesquels sont mis en solution par l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier.

✓ **Preparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. Sortir la galerie de son emballage. Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

✓ **Preparation de l'inoculum**

A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). L'introduire dans 5mL d'eau distillée en réalisant une suspension d'opacité 0,5 Mac Farland.

✓ **Inoculation de la galerie**

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant).

- Remplir tube et cupule pour les tests encadré : CIT |, VP |, GEL |.

- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules), pour les autres tests.

- Créer une anaérobiose pour les tests dont le nom est souligné : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation, Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

✓ **Lecture**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées, puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

-**Test TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-**Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

-**Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

✓ **Identification :**

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Comparer la couleur obtenue pour chaque cupule et inscrire le résultat sur la fiche de résultats. Sur cette fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Pour obtenir le code de 7 chiffres, il faut additionner les résultats des réactions. Une réaction négative donne 0 point tandis qu'une réaction positive donne 1, 2 ou 4 points.

Chercher le code numérique obtenu avec le logiciel d'identification afin de connaître le nom de l'espèce identifiée.

5. Conservation des souches

Cette étape est basée sur l'utilisation des tubes contenant de la gélose nutritive. Une fois ensemencés à l'aide de pipette pasteur ou l'anse de platine, les tubes sont placés à l'étuve pendant 24h à 37°C pour que la croissance débute puis les placés dans un réfrigérateur à 4°C. La conservation se fait en double copie des tubes.

6. Antibiogramme

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton suivant la technique recommandée par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM, 2018**).

6.1. Les antibiotiques à tester

Les disques d'antibiotiques sont les suivants :

Ticarcilline (TIC), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PIP), Pipéracilline+tazobactam (TZP), Ceftazidime (CAZ), Aztréonam (ATM), Imipénème (IPM), Gentamicine (GM), Tobramycine (TM), Amikacine (AN), Ciprofloxacine (CIP), Colistine(CS).

6.2. Technique

Consiste à un ensemencement des boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne correspondant à 0.5 MC Farland.

Cette dernière réalisée avec une culture jeune (18-24h) sur milieu gélosé. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 18-24 heures à 37°C.

6.3. Lecture

La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation des résultats en catégories cliniques : Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les normes et les recommandations du (CASFM, 2018) (Annexe 1).

TROISIEME PARTIE
RESULTATS ET
DISCUSSION

I. Résultats

1. Prélèvements

Durant une période de travail d'un mois (Février à Mars 2020) 33 prélèvements ont été réalisés dont 09 au niveau du service de réanimation, 07 prélèvements au niveau du service de chirurgie, 14 prélèvements au niveau du service de traumatologie et 03 prélèvements au niveau du service de médecine interne. Voici le pourcentage des prélèvements au niveau de chaque service. La répartition des prélèvements selon les services est montrée par l'histogramme ci-après (**Figure 13**).

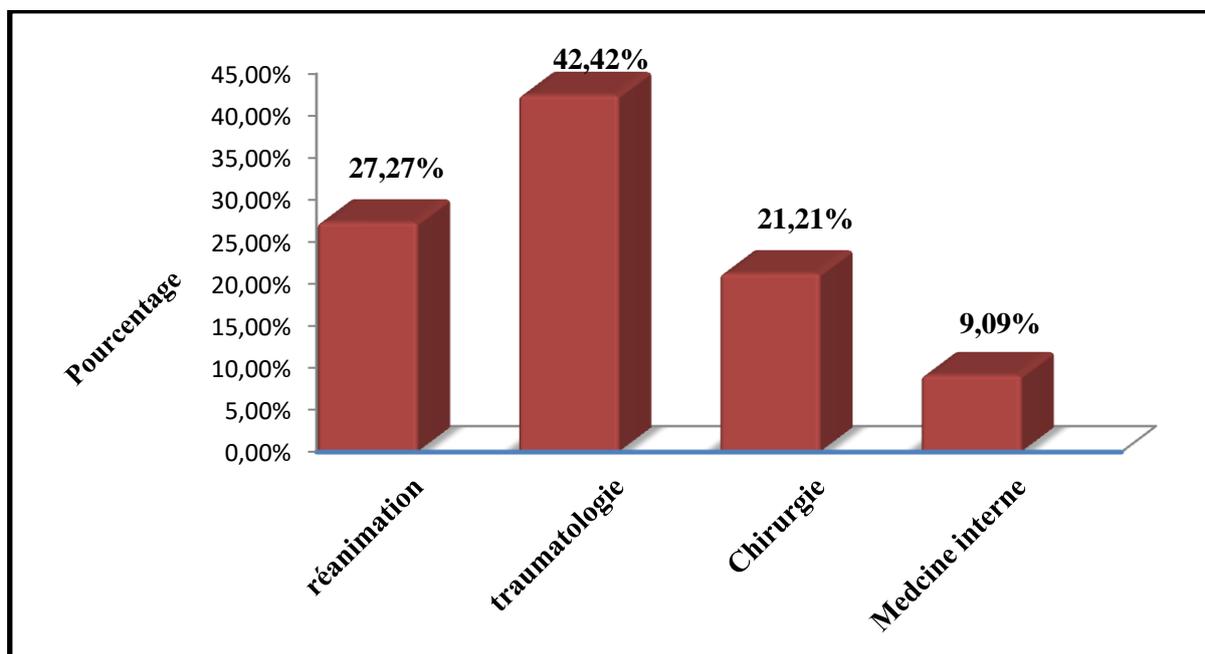


Figure 13. Répartition des prélèvements selon les services

2. Répartition des souches identifiées

L'analyse des prélèvements a permis d'isoler, 32 bacilles à Gram négatif (BGN). Ci-dessous montre que le groupe des non fermentants (BGNnF) présente 14 souches avec un taux de (43.75%), tandis que les entérobactéries présentent un taux de (56.25%) c'est-à-dire 18 souches (**Figure 14**).

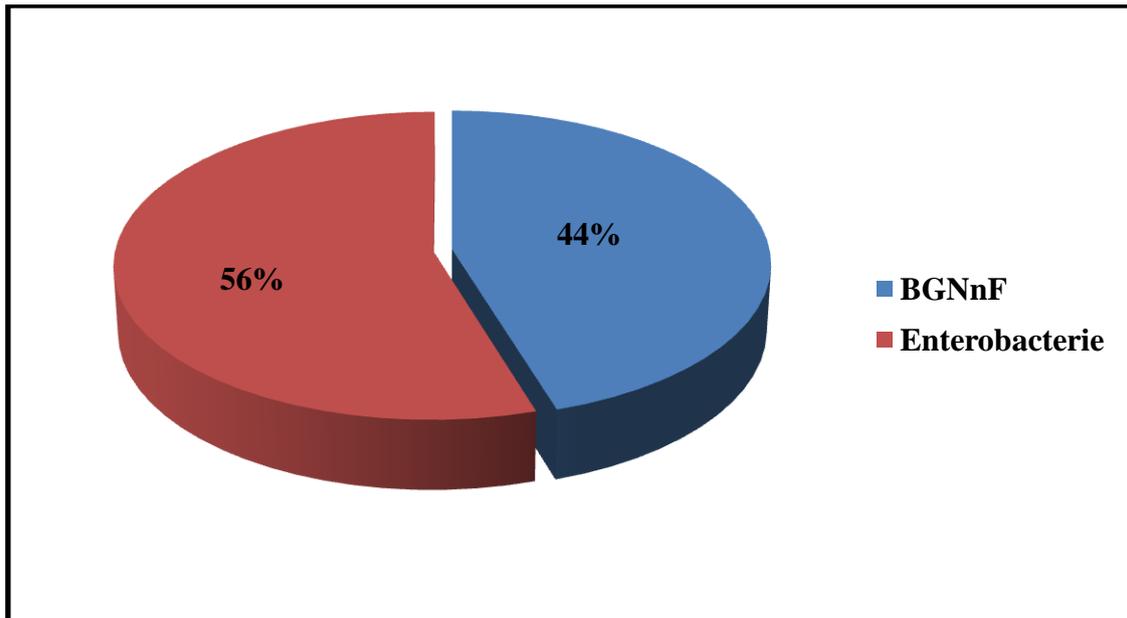


Figure 14. Répartition des bacilles à Gram négatif non fermentants et des entérobactéries.

32 bacilles à Gram négatif ont été isolés durant la période de l'étude sur le total de 33 prélèvements. Le nombre de souches isolées de *Pseudomonas aeruginosa* est de 9, 5 souches d'*Acinetobacter baumannii*, 5 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 5 souches d'*Enterobacter cloacae*, 4 souches d'*E.coli*, et 4 souches de *Serratia marcescens*.

Pseudomonas aeruginosa occupe donc la première place par rapport aux autres BGNs (Figure 15).

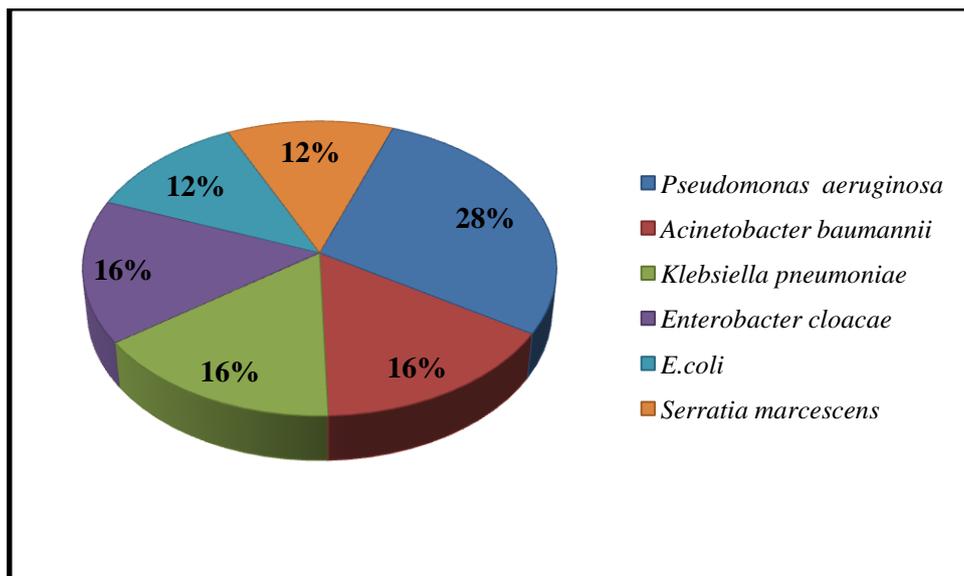


Figure 15. Le taux des différents bacilles à Gram négatif isolés

Les 9 souches de *P. aeruginosa* étaient isolées à partir du service de réanimation (33.34%), le service de traumatologie (33.34%), le service de chirurgie (11.12%) et de médecine interne (22.23%). (**Figure 16**)(Annexe 2).

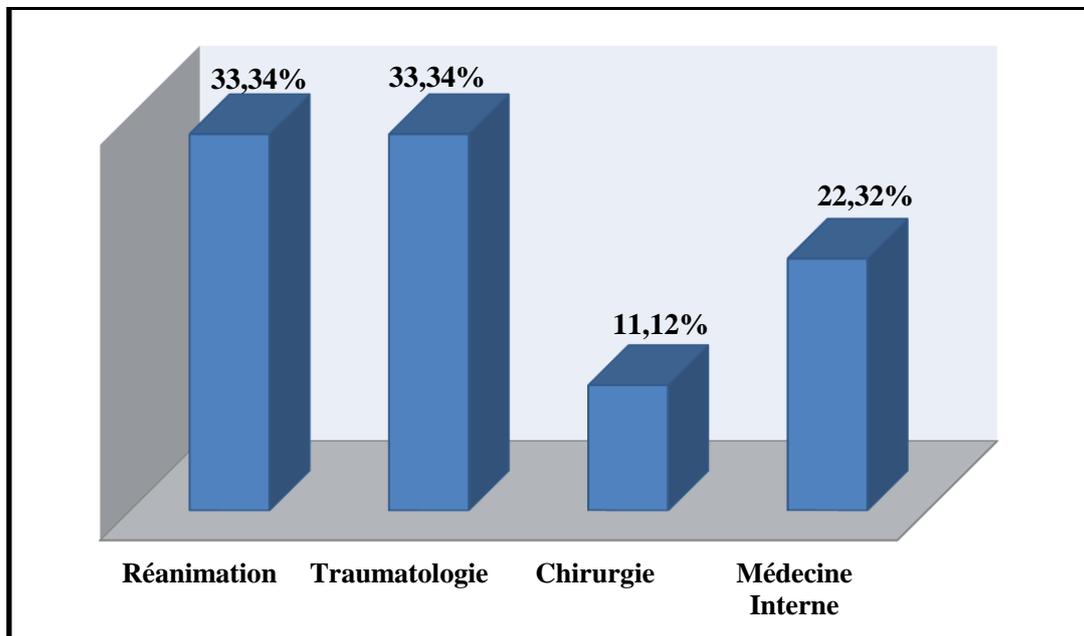


Figure 16. Répartition de *Pseudomonas aeruginosa* selon les services de prélèvements

Ces souches ont été isolées à partir de différents prélèvements pathologiques, essentiellement isolées des plaies (6souches) et des sondes urinaires (2 souches) avec des taux de (66.67%) et (22.32%) respectivement, comprenant aussi les cathéters veineux centraux (11.12%).

3. Identification des souches

3.1. Aspect macroscopique des colonies

L'observation macroscopique des colonies développées sur le milieu Mac Conkey et cétrimide a montré une forme des colonies petites à moyenne, les colonies prennent une forme irrégulière qui est généralement la forme caractéristique de *P. aeruginosa*. Elles sont légèrement bombées avec une odeur aromatique spécifique et avec l'aspect métallique à la surface ainsi qu'une diffusion d'un pigment fluorescent de couleur jaune verdâtre sur milieu cétrimide (**Figure 17**).

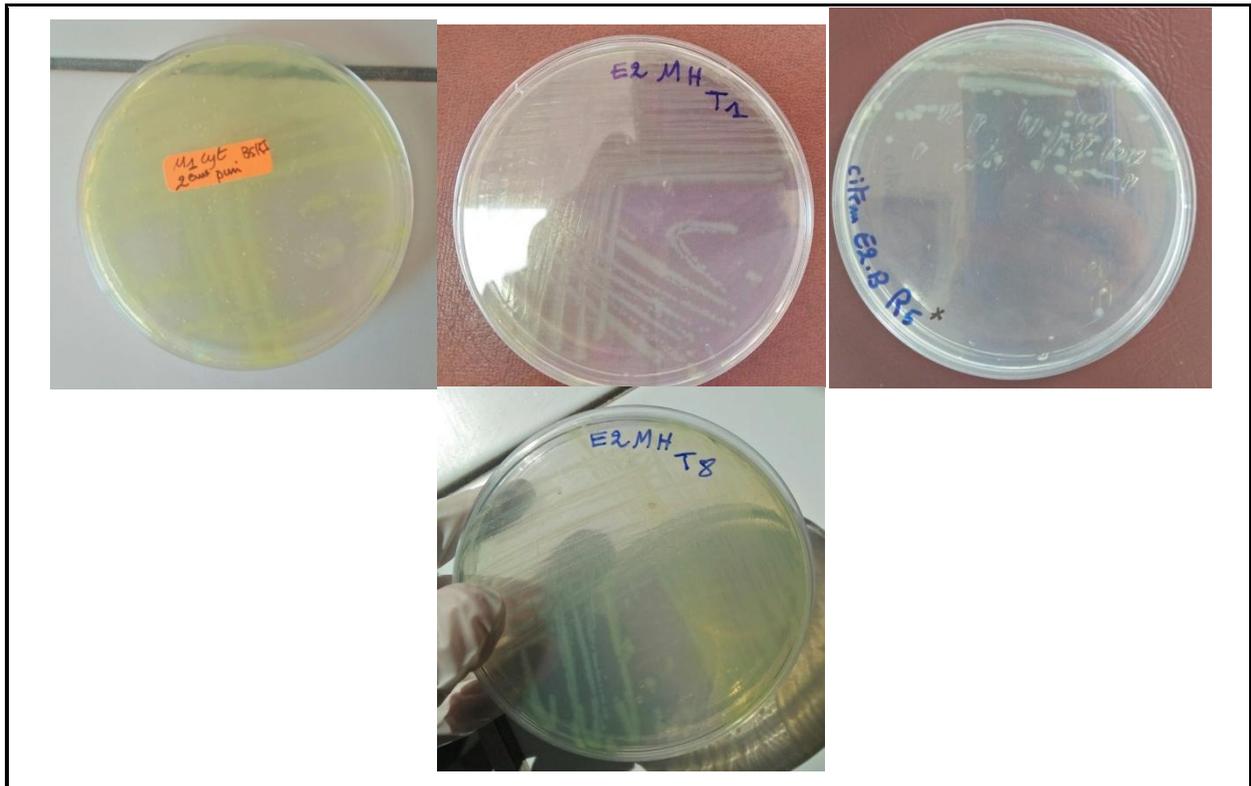


Figure 17. Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur cétrimide

3.2. L'identification biochimique

3.2.1. Test d'oxydase

Ce test est réalisé par le dépôt d'une colonie bactérienne sur un disque d'oxydase. La réaction d'oxydation se traduit par une coloration rose ou violette foncée en deux minutes environ (**Figure 18**).

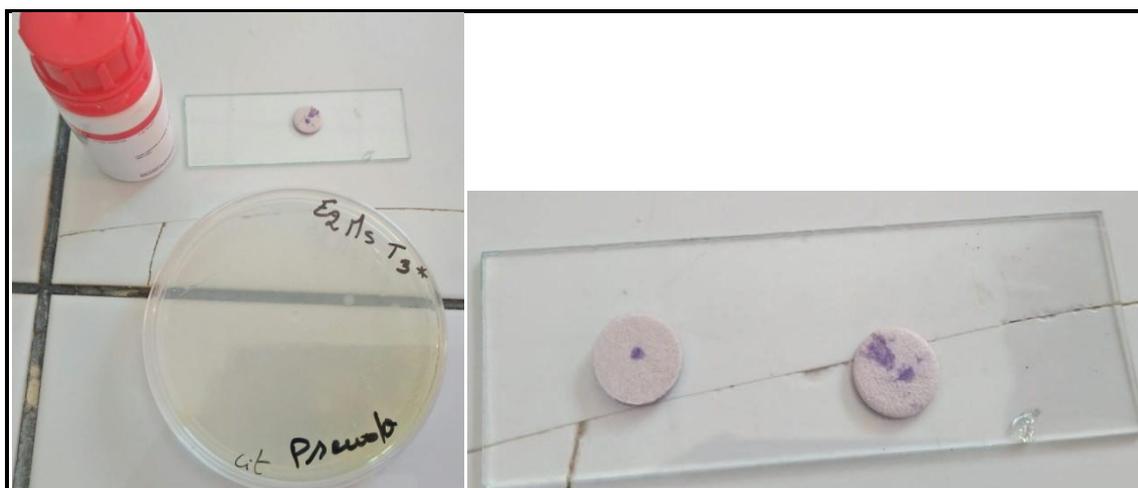


Figure 18. Test oxydase positive d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*

II. Discussion

Pseudomonas aeruginosa représente un modèle d'adaptation particulièrement efficace en terme d'antibiorésistance, sa capacité à survivre dans un environnement hospitalier à long terme et l'émergence de la résistance améliorent sa capacité de propagation nosocomiale (Touati *et al.*, 2013). En Algérie, *P. aeruginosa* se classe la troisième après *Staphylococcus aureus* et *Enterobacteriaceae* parmi les infections nosocomiales au niveau de la réanimation (Rahal *et al.*, 2012).

Au cours de la période de d'étude, nous avons isolé 14 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants isolées au niveau de CHU de Tlemcen, avec un taux de (43.75%). Le profil bactériologique des isolats est marqué par une légère prédominance de *Pseudomonas aeruginosa* (28.12%) par rapport à *Acinetobacter baumannii* (15.62%).

Par contre, les résultats obtenus par Mesli en 2010 montrent que *P. aeruginosa* se classe en deuxième (51 souches avec un taux de 26%) après *Acinetobacter baumannii* (62 souches avec un taux de 32%) à partir de 194 prélèvements effectués sur les patients et sur les 63 prélèvements de l'environnement, 1 *P.aeruginosa* a été isolé (1.6%) et 8 *Acinetobacter baumannii* (12.7%).

Notre étude a montré qu'à partir des prélèvements effectués au niveau du service de réanimation, *Pseudomonas aeruginosa* représente plus de (33.34%) du total des souches isolées (9 souches) dont les prélèvements concernés proviennent dans la moitié des cas des sondes urinaires avec un taux de (22.32%) suivis par les prélèvements des cathéters veineux centraux de (11.12%). Alors que la fréquence d'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* dans le service de traumatologie est de (33.4%) dont le type des prélèvements majoritaire est les plaies d'un taux de (66.67%). Les deux autres services, la chirurgie et la médecine interne présentent une fréquence d'isolement de (11.12%) et (22.23%) respectivement. Nos résultats concordent avec les données d'une étude de Sefraoui(2015) avec des fréquences d'isolement au niveau du service de réanimation qui est de (65.90%), la chirurgie (15.21%), service de traumatologie (5.07%) et la médecine interne (2.30%); ces résultats sont obtenus des trois hôpitaux de l'ouest algérien. Par ailleurs, *P.aeruginosa* occupe la première place avec un taux d'isolement de (69%) au niveau des plaies chirurgicales (Mesli, 2010).

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement. Les récentes données de

résistance aux antibiotiques en Algérie indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays (**Baba Ahmed et Arlet, 2014**). *P.aeruginosa* est naturellement résistant à divers antibiotiques. Les fluoroquinolones, les aminosides, certaines β -lactamines dont les carbapénèmes et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. La résistance acquise à ces types d'antibiotiques est courante, ce qui complique de plus en plus la gestion des infections à *P. aeruginosa* (**Meradji, 2016**).

La résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNnF) aux β -lactamines notamment *Pseudomonas aeruginosa* pose un véritable problème épidémique. En effet, une étude sur la résistance et l'épidémiologie des souches cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie en 2008 réalisée par **Drissi et al** a montré un taux élevé de résistance à l'imipénème (35%) plus important par rapport à ceux habituellement observés dans les pays européens (**E.R.S.S.,2007**). Le mécanisme de résistance isolé à l'imipénème est certainement lié à la modification de la porine D2 spécifique de la perméabilité de *P. aeruginosa* à cet antibiotique. La résistance enzymatique liée à la production d'une β -lactamase acquise de type pénicillinase TEM-110 a été détectée entre 2005 et 2007 à l'hôpital de Tlemcen (**Drissi et al., 2008**).

L'étude effectuée par Mesli a constaté que le seul mécanisme non enzymatique de la résistance vis-à-vis les β -lactamines est représenté par l'efflux (19%). Les mécanismes enzymatiques sont présentés par l'hyperproduction de la céphalosporinase isolée (4%) qui peut être associée à la perte de porine OprD2 (2%). Le reste est présenté par le phénotype sauvage (**Mesli, 2010**).

Au nord-est algérien, les résultats de Touati obtenus pour la résistance la plus élevée aux β -lactamines montrent le groupe des carbapénèmes avec une résistance à l'imipénème de (50%) plus élevée par rapport aux résultats de Drissi à l'hôpital de Tlemcen, suivi par le groupe des céphèmes avec une résistance à la cefsulodine de (44.11%), le groupe des pénames avec une résistance qui varie de (16) à (33%). La résistance la plus faible est pour le groupe des monobactames avec (3.3%). Les aminosides sont de (6.6%) et les fluoroquinolones de (56.6%) (**Touati, 2013**). La présence du gène VIM-2 métallo- β -lactamase, a été décrite pour la première fois par **Touati et ces collaborateurs**, ce gène est produit par 14 souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des prélèvements issus des services de réanimation aux CHU de Annaba- Algérie (**Touati et al., 2013**). Dans une autre étude de l'hôpital universitaire

d'Annaba de 2012 à 2015, **Meradji** a montré que les taux de résistance à l'imipénème et à la ceftazidime étaient respectivement de (29%) et (58,1%) (**Meradji, 2016**).

En 2015, **Sefraoui** a noté, que le taux de résistance à l'imipénème a considérablement diminué (6,1%) au CHU de Tlemcen dans cette étude par rapport à l'étude précédente menée par **Drissi et ses collaborateurs** (35%) dans le même hôpital (**Drissi et al., 2008**). L'hôpital de Sidi Bel Abbes demeure en seconde position après le CHU d'Oran avec un taux de résistance de (12,5%) à l'imipénème. D'après les constatations, les mutations oprD étaient le principal mécanisme de la résistance à l'imipénème (**Sefraoui, 2015**).

Le gène bla_{VIM-2} codant une métallo-β-lactamase a été détecté chez deux souches isolées de CHU d'Oran, cette étude représente la deuxième description de *P. aeruginosa* productrices de VIM2 en Algérie, coïncidé avec la période d'étude de **Touati et ses collaborateurs** (**Sefraoui, 2015**).

Les souches de *P.aeruginosa* isolées dans l'étude de **Meradji** allant de 2012 à 2013 ont montré une résistance significative aux aminosides: tobramycine (30%), gentamicine (21,75%) et amikacine (7%) (**Meradji, 2016**). Ces taux de résistance trouvés sont proches des études du nord-ouest de l'Algérie: gentamicine (34,2%), tobramycine (30,4%) et amikacine (7,6%) (**Sefraoui et al., 2014**). Ces résultats sont toujours supérieurs aux résultats rapportés par **Touati et ses collaborateurs** dans une étude rétrospective menée dans l'unité de soins intensifs au CHU à Annaba. Le pourcentage relatif de gentamicine était de (30%) et une sensibilité globale de toutes les souches pour l'amikacine (**Touati et al., 2013**).

L'étude de **Touati et ses collaborateurs** et l'étude de **Drissi et al** ont montré des taux de résistance à la ciprofloxacine de (20%) et (10%) respectivement (**Touati et al., 2013 ; Drissi et al., 2008**). Alors qu'au niveau de l'hôpital d'Oran, la résistance à la ciprofloxacine (41,8%) était de haut niveau probablement en relation avec l'usage abusif de cette molécule au cours de la période de cette étude (**Sefraoui, 2015**). Dans l'étude de **Meradji**, la plupart des souches de *P.aeruginosa* ont montré une résistance à la ciprofloxacine et/ou lévofloxacine sans générer de déterminants plasmidiques résistants aux quinolones. Ce résultat indique que le principal mécanisme de résistance des souches étudiées aux fluoroquinolones peut être dû à des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour la gyrase ou la topoisomérase (**Meradji, 2016**). D'autre part, aucune souche résistante à la colistine n'a été isolée (**Sefraoui, 2015**).

Les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime au CHU de Constantine (22.35% et 24.10% respectivement) sont beaucoup plus élevés par rapport à ceux observés au CHU d'Oran (13.63% et 20.45% respectivement), selon le 18^{ème} Rapport d'évaluation du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques (**Rahal *et al.*, 2017**). Ces résultats comparés avec le 19^{ème} rapport d'évaluation, les taux de résistances au niveau du CHU de Constantine sont élevés pour l'imipénème et la ceftazidime (33.30% et 40.40% respectivement). Une augmentation légère été observée au niveau du CHU d'Oran pour l'imipénème (15%) et la ceftazidime (25.42%) (**Rahal *et al.*, 2018**).

Vu la situation sanitaire actuelle imposée par la pandémie du COVID-19, nous n'avons pas pu faire et réaliser le test d'antibiogramme donc on n'a pas obtenue des résultats de la résistance aux antibiotiques de nos souches.

CONCLUSION

Sur la base des travaux réalisés sur la résistance des bactéries aux antibiotiques, nous avons observé que cette situation évolue en Algérie et est devenue un problème de santé publique majeur dans le monde. *Pseudomonas aeruginosa* est un problème émergent de multirésistance aux antibiotiques sous le terme de BMR. En raison de ce phénomène, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites.

Cette souche peut naturellement résister à plusieurs antibiotiques et acquérir de multiples mécanismes de résistance. Les études sur la résistance aux ATBs vis-à-vis de ce pathogène ont montré d'importants taux de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (tels que les β -lactamines, les aminosides et les quinolones).

Par ailleurs, des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème ont été détectées dans les principaux hôpitaux universitaires d'Algérie. Ces résultats indiquent que l'inactivation par mutation du gène *oprD* est le principal mécanisme de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'imipénème. En effet, l'absence de résistance vis-à-vis de la colistine conforte l'idée que cette molécule reste la seule molécule active pour le traitement des infections causées par les bacilles à Gram négatif multirésistants.

La propagation rapide des souches résistantes aux antibiotiques est la principale menace thérapeutique et épidémiologique. Il est donc important de mener des actions de sensibilisation sur le bon usage des antibiotiques et d'exiger des procédures d'assainissement strictes pour limiter l'émergence et la diffusion de souches multi-résistantes et préserver les molécules actives.

En perspective, les résultats que nous avons obtenus sont encore préliminaires et méritent d'être développés par :

- ❖ Prolonger la période de stage raccourcie en raison de la pandémie de Covid-19;
- ❖ Augmenter le nombre des prélèvements pour étudier une population bactérienne plus importante et réaliser d'autre prélèvement aux niveaux des autres services du CHU;
- ❖ Mettre en place un réseau de surveillance des bactéries antibiorésistance afin d'optimiser le traitement des infections causées par ces bactéries;
- ❖ Renforcer des mesures d'hygiène hospitalière;
- ❖ Créer un laboratoire de microbiologie moléculaire pour étudier l'environnement génétique des gènes de résistance aux antibiotiques afin de mieux comprendre son mécanisme de transmission;

- ❖ Réglementer la vente et l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Aggoune-Khinache,N., Bensorsa,D., Henniche,F.Z., Daoudi,M., Abdouni,M.A., Chabani,A et al. (2009). [Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria]. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39 (6) 413–414.
- Al-Aloul, M., Crawley, J., Winstanley, C., Hart, C. A., Ledson, M. J., and Walshaw, M. J. (2004). Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*, 59, 334-336.
- Allain , P. (2008). Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments 3èmes édition.
- Avril JL, Tardivel R. (1996). [Bacterial complications of blood transfusions]. *Transfus Clin Biol*, 3: 43-9.
- Ayad, A. (2017). Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien. [Thèse Doctorat]. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., & Arlet, G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169–178.
- Bagge, N., O. Ciofu, et al. (2002). "Constitutive high expression of chromosomal betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD." *Antimicrob Agents Chemother*, 46(11): 3406-3411.
- Barbier, F., Wolff M. (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique ? *Med Sci*, 26(11): 960 – 968.
- Ben Haj Khalifa, A., D. Moissenet, et al. (2011). "Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation." *Ann Biol Clin*, 69(4): 393-403.
- Bergmans,D.C., Bonten,M.J., van Tiel,F.H., Gaillard,C.A., van der Geest,S., Wilting,R.M. et al. (1998). Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*, 53: 1053-1058.
- Bert,F., Branger,C., and Lambert-Zechovsky,N. (2002). Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*, 50: 11-18.
- Bonnet, R. (2006). β -lactamines et entérobactéries. In: Courvalin, P., Leclerck, R., Bingen, E. *Antibiogramme. Paris. ESKA : 2ème édition* 15: 141-62.
- Bouguenoun, W. (2017). Étude de la Résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. [Thèse Doctorat]. Université Badji Mokhtar-Annaba.
- Bradford, P. A. (2001). "What's New in beta-lactamases?" *Curr Infect Dis Rep*, 3(1): 13-19.

-
- Brenner, Don & Krieg, Noel & Staley, James & Garrity, George & Boone, David & De Vos, Paul & Goodfellow, Michael & Rainey, Fred & Schleifer, Karl. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2, The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria.*
- Bryskier, A. (1999).** *Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques.* Ed Ellipses.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M., and Sack, J.L. (2001).** Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*, 63, 2413–2420.
- CA-SFM. (2018).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
- Cattoir, V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52 (10): 607-616.
- Cavallo, J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).** Béta-lactamines. *EMC Maladies Infectieuses*, 1 : 129-202.
- CAZES , M. (2017).** La Dispensation des Fluoroquinolones par le Pharmacien D'officine. [Thèse Doctorat]. Université TOULOUSE III PAUL SABATIER- France.
- Chan, K. G., Yin, W. F., & Lim, Y. L. (2014).** Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain YL84, a Quorum-Sensing Strain Isolated from Compost. *Genome announcements*, 2(2), e00246-14.
- Chidiac, C., J. D. Cavallo, R. Cohen, M. Dupon, T. Galperine, et al. (2015).** Mise au point sur le bon usage des fluoroquinolones administrées par voie systémique chez l'adulte (ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, norfloxacine, ofloxacine, péfloxacine). *Médecine et Maladies Infectieuses, Elsevier Masson*, 45 (9), pp.348-373.
- Chung, D.R., Song, J.-H., Kim, S.H., Thamlikitkul, V., Huang, S.-G., Wang, H., So, T.M.-K., Yasin, R.M.D., Hsueh, P.-R., Carlos, C.C., et al. (2011).** High prevalence of multidrug-resistant non fermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 1409–1417.
- Costerton , JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745.
- Courvalin, P., Denis, F., Ploy, M.C., garilhe, M.P.D., Trieu-Culot, P., and Universalis. (2001)** "Antibiotiques". Retrieved 24 Mai, 2013.
- Daly, J.A., Boshard, R., and Matsen, J.M. (1984).** Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol*: 19, 742–743.

-
- Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., & Naas, T. (2016).** Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal Des Anti-Infectieux*, 18(4), 139-159.
- Drissi, M., Ahmed, Z. B., Dehecq, B., Bakour, R., Plésiat, P., & Hocquet, D. (2008).** Antibiotic susceptibility and mechanisms of β -lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: First report in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38(4), 187–191.
- Dubois, V., Arpin, C., Dupart, V., Scavelli, A., Coulange, L., Andre, C. et al. (2008).** Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J Antimicrob Chemother*, 62(2): 316-323.
- Dubois,V., Arpin,C., Noury,P., and Quentin,C. (2002a).** Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(11): 3624-3626.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., and Falagas, M.E. (2009).** Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents*, 33: 201-205.
- El-Mahdy, T.S. (2013)** .The extended-spectrum AmpC genotype of *Pseudomonas aeruginosa* strains from Egypt: an underlying threat to anti-pseudomonal treatment options. *J Chemother*, 26: 187-9.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System**, <http://www.rivm.nl/earss> [accessed 1.09.07].
- Eyquem , A., Alouf J., Montagnier L. (2000).** Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments. pp43.
- Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. (2005).** Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1333–1341.
- Frikh, M., Maleb A., Nyaledome Ablavi I., Elouennass M., Lemouer A. (2017).** *Pseudomonas aeruginosa* : Epidémiologie et état actuel des résistances Etude retrospective sur trois ans. *Journal Marocain des Sciences Médicales*, 21(2): 34-40.
- Garcia-Rodriguez, J-A., Jones, R.N., & And The Mystic Programme Study Group. (2002).** Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Isolates from European Intensive Care Units: Data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, *Journal of Chemotherapy*, 14(1): 25-32.

-
- Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67, 159–173.
- Glupczynski,Y., Bogaerts,P., Deplano,A., Berhin,C., Huang,T.D., Van,E.J., and RodriguezVillalobos,H.(2010).** Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 65: 866-871.
- Hafiane, A., and Ravaoarino, M. (2008).** [Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]. *Med Mal Infect*, 38: 238-247
- Hermann, T. (2007).** Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci*, 64: 1841-1852.
- Higgins, P. G., A. C. Fluit, et al. (2003).** "Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Int J Antimicrob Agents*, 21(5): 409-413.
- Hocquet,D., Roussel-Delvallez,M., Cavallo,J.D., and Plesiat,P. (2007).** MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1582-1583.
- Hugh, R., and Leifson, E. (1964).** The proposed Neotype Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 14,69–84.
- Jacoby, G.A. (2005).** Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 2: S120-S126.
- Jalal, S., O. Ciofu, N. Hoiby, N. Gotoh, and B. Wretlind. (2000).** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 44:710-2.
- Jana, S., & Deb, J. K. (2006).** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 140–150.
- JAYOL, A. (2018).** Résistance à la colistine chez les bacilles Gram négatif. [Thèse Doctorat]. Université de Bordeaux- France.
- Kalai, S., Jouaihia, W., Mahjoubi, F., Ghazzi, R., Thabet, L., Ben, R.S. et al. (2004)** [*Pseudomonas aeruginosa*: a multicentric study of antibiotic resistance (1999-2000)]. *Tunis Med*, 82(12): 1070-1074.
- Kattan, JN, Villegas MV, Quinn JP. (2008).** New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect*, 14: 1102-11
- Klimek, JW., Cavallito, CJ., Bailey, JH. (1946).** Induced resistance of *Staphylococcus aureus* to antibiotics. *J Bacteriol*. 51: 580.

-
- Krcmery, V, Koprnova J, Gogova M, Grey E, Korcova J. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in cancer patients. *J Infect*, 52: 461-463.
- Lambert, P.A. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 95, 22–26.
- Lazdunski, A. (2003).** "[*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]." *Ann Fr Anesth Reanim*, 22(6): 523-526.
- Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E. (2001).** In vitro selection of a target /efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Agents*. 48(4) :553-5.
- Lee, J.-Y., Na, I. Y., Park, Y. K., & Ko, K. S. (2014).** Genomic variations between colistin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1248–1256.
- Lee, K., Lee, M., Shin, J.H., Lee, M.H., Kang, S.H., Park, A.J., et al. (2006).** Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Microb Drug Resist*, 12: 44–49.
- Lianes, C., D. Hocquet, C. Vogne, D. Benali-Baitich, C. Neuwirth, and P.Plesiat. (2004).** Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:1797–1802.
- Lister,P.D., Wolter,D.J., and Hanson,N.D. (2009).** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22: 582-610.
- Livermore, D.M. (1995).** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol*, 8: 557-84.
- Magnet, S., Blanchard, J.S. (2005).** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*. 105:477–98
- Mahenthalingam,E., Campbell,M.E., Foster,J., Lam,J.S., and Speert,D.P. (1996).** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 34: 1129-1135
- Marchandin,H., Jean-Pierre,H., De,C.C., Sirot,D., Darbas,H., Perigault,P.F., and Carriere,C. (2000).** Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 213-216.
- Mathlouthi,N. , Areig, Z., Al Bayssari, C., Bakour,S., Ali El Salabi A., BenGwierif, S-Zorgani,A.A.,Ben Slama, K., Chouchani,C., Rolain,J.M. (2015).**Emergence of

CarbapenemResistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 335–341.

-**Meradji, S. (2016)**. *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. [Thèse Doctorat]. Université Badji Mokhtar – Annaba.

-**Mérens, Audrey & Delacour, Hervé & Plesiat, Patrick & Cavallo, Jean-Didier & Jeannot, Katy. (2011)**. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011 : 49–62.

-**Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, et al. (2007)**. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, 13(6):560-578.

-**Mesli, E. (2010)**. Etude de la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinéto baumannii*. [magister]. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

-**Micek, S. T., Welch, E. C., Khan, J., Pervez, M., Doherty, J. A., Reichley, R. M., Hoppe-Bauer, J. Dunne, W. M. & Kollef, M. H. (2011)**. Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med*, 6 : 405-410.

-**Minchella,A., Molinari,L., Alonso,S., Bouziges,N., Sotto,A., and Lavigne,J.P. (2010)**. [Evolution of antimicrobial resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital between 2002 and 2006]. *Pathol Biol (Paris)* 58: 1-6.

-**Monlezun, L. (2012)**. Etudes structurales et fonctionnelles de la pompe d'efflux MexAB-OprM impliquée dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine humaine et pathologie*. [Thèse Doctorat]. Université René Descartes - Paris V.

-**Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van De Peer, Y.,De Wachter, R., and Timmis, K.N. (1996)**. The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 478–492.

-**Mugnier,P., Dubrous,P., Casin,I., Arlet,G., and Collatz,E. (1996)**. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40(11): 2488-2493.

-**Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. (2014)**. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*, 3(1):32.

-
- Nauciel, C., et Vildé, J.L. (2005).** Bactériologie médicale. 2 ème édition p: 45.
- Nguyen, J.C., and Lambert, T. (2012).** Interpretative analysis of aminoglycoside resistance by- the antibiogram. *Rev Francoph Lab*, 445: 75-77.
- Nikaido, H. (1998).** Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis*, 27 Suppl 1, S32-41.
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2002).** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobies. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), 321–331.
- Ojeniyi, B. (1994).** Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl*, 46, 1–44.
- Pagès Jean-M. (2004).** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Société de la revue médecine/sciences*. Éditions EDK. 20(3): 346-351.
- Pai, H., J. Kim, et al. (2001).** "Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother*, 45(2): 480-484.
- Palleroni, N. (1984).** Manual of Systematic Bacteriology. USA, 141–171.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011).** Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960.
- Philippon, A. (2008).** Entérobactéries des bêta-lactamines. *Elsevier Masson SAS, Paris-Biologie clinique 90-05-0145*: 1-18.
- Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., ... De Vos, D. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* Population Structure Revisited. *PLoS ONE*, 4(11), e7740.
- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T., and Nordmann, P. (2001a)** OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* 45(2): 447-453.
- Poirel, L., Ronco, E., Naas, T., and Nordmann, P. (1999)** .Extended-spectrum beta-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 5(10): 651-652.
- Poole, K. (2005).** Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 479–487.
- Poole, K. (2011).** *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*, 2 :65.
- Rahal K., Belouni R., Tali-Maamar H., Boudouane M., Missoum M.F.K., Benslimani A., Aboun A. (2017).** Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

-
- Rahal K., Belouni R., Tali-Maamar H., Boudouane M., Missoum M.F.K., Benslimani A., Aboun A. (2018).** Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Rahal K., Belouni R., Tali-Maamar H., Boudouane M., Missoum M.F.K., Benslimani A., Aboun A. (2012).** Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Ramirez, M.S., and Tolmasky, M.E. (2010).** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13: 151-171.
- Ramos, G. P., Rocha, J. L., & Tuon, F. F. (2013).** Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(9), e757–e761.
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014).** Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445.
- Robin, F., Gibold, L., Bonnet, R. (2012).** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Elsevier Masson SAS*, 445:47–58.
- Rodriguez-Villalobos, H., Struelens, M.-J. (2006).** Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*, 15 (2006) 205–213.
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., et al. (2010).** Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE*, 5, e8842.
- Ruppé, E. (2010).** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*, 12(1), 3–16.
- Saffiedine, B. (2019).** Contribution à l'étude du système BAC « Biofilm Associated Cluster chez *Pseudomonas aeruginosa*. [Thèse Doctorat]. Université de Rouen-Normandie.
- Saito, K., H. Yoneyama, et al. (1999).** "nalB-type mutations causing the over expression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome." *FEMS Microbiol Lett*, 179(1): 67-72.
- Sakyo, S., H. Tomita, K. Tanimoto, S. Fujimoto, and Y. Ike. (2006).** Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.* 59:220–22.

-
- Schweizer, H. P. (2003)**. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions *Genet. Mol Res*, 2 :48-62.
- Sefraoui, I. (2015)**. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. [Thèse Doctorat]. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2014)**. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated from Western Algeria Between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 156–161.
- Sligl W, Taylor G, Brindley PG., (2006)**. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis*, 10(4):320-325.
- Soussy, C.J. (2006)**. Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E. *ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA*, Paris; p263-275.
- Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrenner,P., Hickey,M.J. et al. (2000)**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.
- Strateva, T., and Yordanov, D. (2009)**. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, 58: 1133-1148.
- Talon,D., Capellier,G., Boillot,A., and Michel-Briand,Y.,(1995)**. Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Med*, 21: 996-1002.
- Tankovic, J. (2000)**. Mécanismes d'action des antibiotiques. Précis de bactériologie cilique. *Edition Eska*. P: 584-595.
- Terrier, C., Hansen, W., Renaud, F., Freney, J. (1992)**. *Pseudomonas*. *Manuel de Bactériologie Clinique*. Elsevier. 2: 941-952.
- Touati, M. (2013)**. Antibiorésistance des bacilles à Gram négatif non fermentant isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. [Thèse Doctorat]. Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie). 137p.
- Touati, M. Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & Rolain, J.-M. (2013)**. Dissemination of a Class I Integron Carrying VIM-2 Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital Intensive Care Unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2426–2427.
- Toure, F. (2004)**. Résistance aux bêta-lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A.LE DANTEC. [Thèse Doctorat].

-
- Van Alst, N. E., Wellington, M., Clark, V. L., Haidaris, C. G., & Iglewski, B. H. (2009).** Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 77(10), 4446–4454.
- Vedel, G. (2005).** Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), p 657–664.
- Vettoretti, L. (2009).** Adaptation des Mécanismes de Résistance par Efflux Actif chez les Souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la Mucoviscidose. *Bactériologie*. Université de Franche-Comté.
- Walsh, C. (2003).** Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *ASM Press* 335 pages.
- Weldhagen, G. F., Poirel, L. & Nordmann, P. (2003).** Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2385–2392.
- Winstanley, C., Langille, M.G.I., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N.R., Winsor, G.L., Quail, M.A., Lennard, N., et al. (2009).** Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 19, 12–23.
- Yala, D., Merad, A., Mohamedi, D., Ouar Korich, M.N. (2001).** Classification et Mode d'Action des Antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91(1).
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., ... Arakawa, Y. (2003).** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*, 362(9399), 1888–1893.

ANNEXES

Annexe 1 Diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour*Pseudomonas aeruginosa* (CASFM, 2018)

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge Des disques	Diamètres critiques (mm)	
				S \geq	R<
B-lactamines	Ticarcilline	TIC	75	18	18
	Ticarcilline+ac. clavulanique	TCC	75-10	18	18
	Pipéracilline	PIP	30	18	18
	Astréonam	ATM	30	25	22
	Ceftazidime	CAZ	10	16	16
	Imipénème	IMP	10	20	17
Aminosides	Tombramycine	TOB	10	16	16
	Gentamycine	GN	10	15	15
	Amikacine	AK	30	18	15
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	26	26
Autres	Colistine	CS	50		

Annexe 2 Récapitulatifs des 9 souches *Pseudomonas aeruginosa* isolées de CHU de Tlemcen

Service	Code échantillon	Type de prélèvement	Sexe	Age	Maladie	Traitement
Réanimation	E2MSR1	Sonde Urinaire	Femme	53 ans	La vessie	/
Réanimation	E2MSR2	Cathéter veineux central	Femme	19 ans	Diabétique, Choc septique et Résistance aux ATB	/
Réanimation	E2MSR5	Sonde Urinaire	Homme	32 ans	/	Ertapénème Amiklin
Traumatologie	E2MST1	Pus	Femme	80 ans	Amputation du bras Diabétique	/
Traumatologie	E2MST3	Pus d'escarre	Homme	41 ans	/	/
Traumatologie	E2MST8	Pus	Homme	33 ans	Diabétique	/
Chirurgie	C2 Cyt Ps	Pus	Homme	86 ans	Diabète	/
Médecine interne	M1 Cyt Ps	Pus	Femme	51 ans	Diabète Nécrose des 2 orteilles	/
Médecine interne	M2 Cyt Ps	Pus	Homme	60 ans	Diabète	/

Annexe 3 Tableau de lecture des résultats de la galerie 20E

TESTS	COMPOSANTSACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune(1)
ADH	L-arginine	1,9	ArginineDiHydrolase	Jaune	rouge/ orangé(2)
LDC	L-lysine	1,9	LysineDéCarboxylase	Jaune	rouge/ orangé(2)
ODC	L-ornithine	1,9	OrnithineDéCarboxylase	Jaune	rouge/ orangé(2)
CIT	trisodiumcitrate	0,756	utilisationduCITrate	vertpâle/ jaune	bleu-vert/ bleu(3)
H2S	sodiumthiosulfate	0,075	productiond'H2S	incolore/ grisâtre	dépotnoir/ finliséré
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	rouge/ orangé(2)
TDA	L-tryptophane	0,38	TryptophaneDésAminase	Jaune	TDA/immédia marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	productiond'INDole	Incolore vertpâle/ jaune	JAMES/immédia rose
VP	sodiumpyruvate	1,9	productiond'acétolne (VogesProskauer)	incolore/ rosepale	VP1+VP2/10min rose/ rouge(5)
GEL	Gélatin (originebovine)	0,6	Gélatinase(GELatine)	nondiffusion	diffusiondupigmentnoir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation/ oxydation (GLUcose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune/ jaunegrise
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation/ oxydation (MANnitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
INO	Inositol	1,9	fermentation/ oxydation (INOsitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation/ oxydation (SORbitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation/ oxydation (RHAmnose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation/ oxydation (SACcharose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation/ oxydation (MELibiose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation/ oxydation (AMYgdaline)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation/ oxydation (ARAbinose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune

