

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mag  
137/1

MEMOIRE DE MAGISTER

THEME

Etude de la résistance aux antibiotiques de  
*Pseudomonas aeruginosa* au niveau de deux services du  
C.H.U de Tlemcen : Neurochirurgie & Traumatologie

Présenté par

M<sup>lle</sup> BABA AHMED Zahira Zakia

Mr TALEB BENDIAB S.A

Mr MOUSSA BOUDJEMAA B

Mr BOUCHERIT K

Mr DRISSI M

Mr ABDELOUAHID D.E

Président

Examineur

Examineur

Co-Promoteur

Promoteur

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN**

**FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE MAGISTER**

**THEME**

**Etude de la résistance aux antibiotiques de  
*Pseudomonas aeruginosa* au niveau de deux services du  
C.H.U de Tlemcen : Neurochirurgie & Traumatologie**

Présenté par

**M<sup>elle</sup> BABA AHMED Zahira Zakia**

**Mr TALEB BENDIAB S.A**

**Mr MOUSSA BOUDJEMAA B**

**Mr BOUCHERIT K**

**Mr DRISSI M**

**Mr ABDELOUAHID D.E**

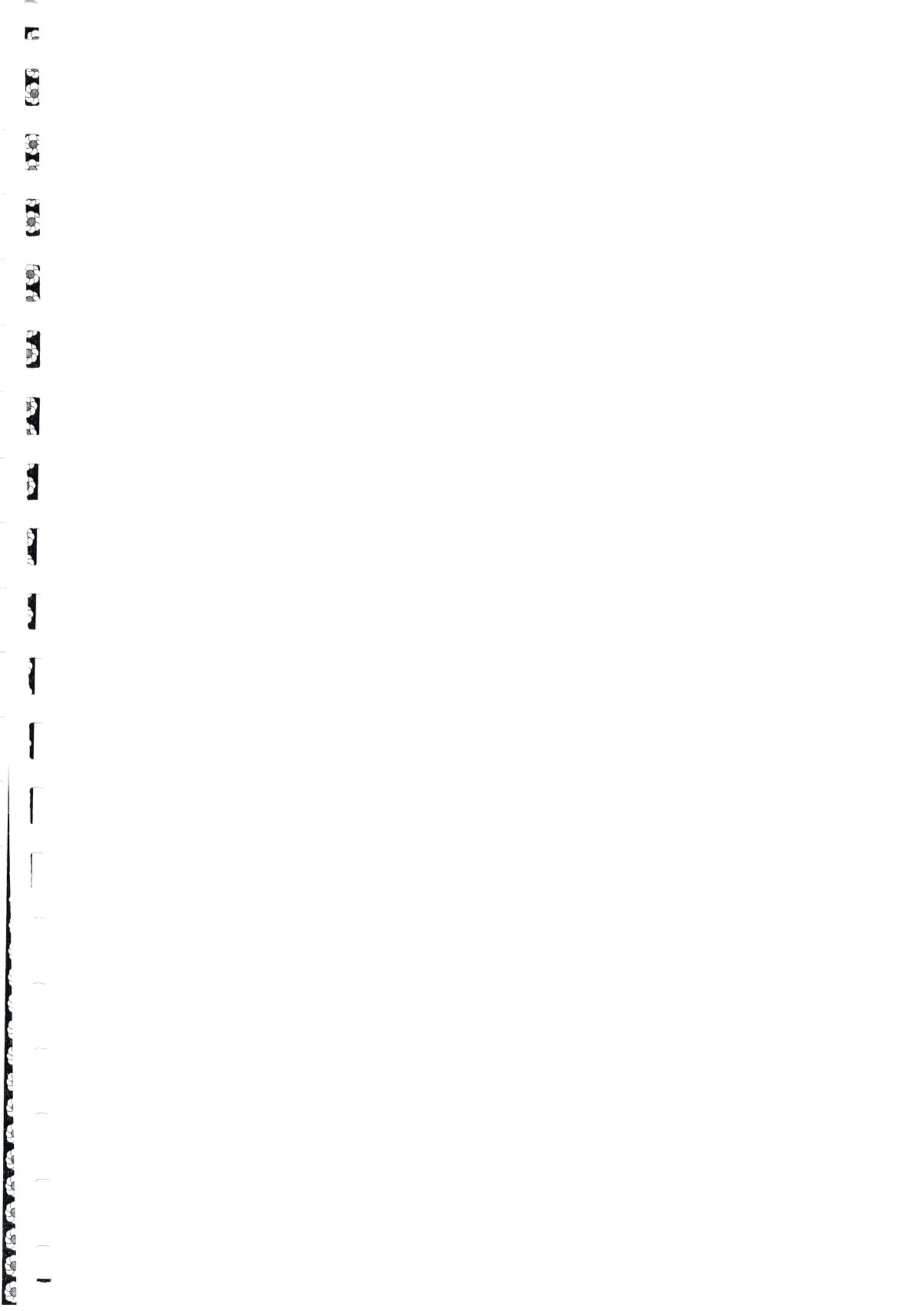
**Président**

**Examineur**

**Examineur**

**Co-Promoteur**

**Promoteur**



*Je tiens à remercier aussi*

*Mr KARAM N.E, Professeur à l'Université d'Oran-Senia et Directeur du Laboratoire « Biologie des Microorganismes et Biotechnologie », pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe.*

*Mr BAKOUR R, Professeur à l'Université d'Alger et Directeur du Laboratoire de « Génétique », pour son accueil au laboratoire.*

*Melle MESSAI Y, Maître de Conférence à l'Université d'Alger, pour m'avoir aidée et remis les souches de référence Pbr 322 et pkr 2013.*

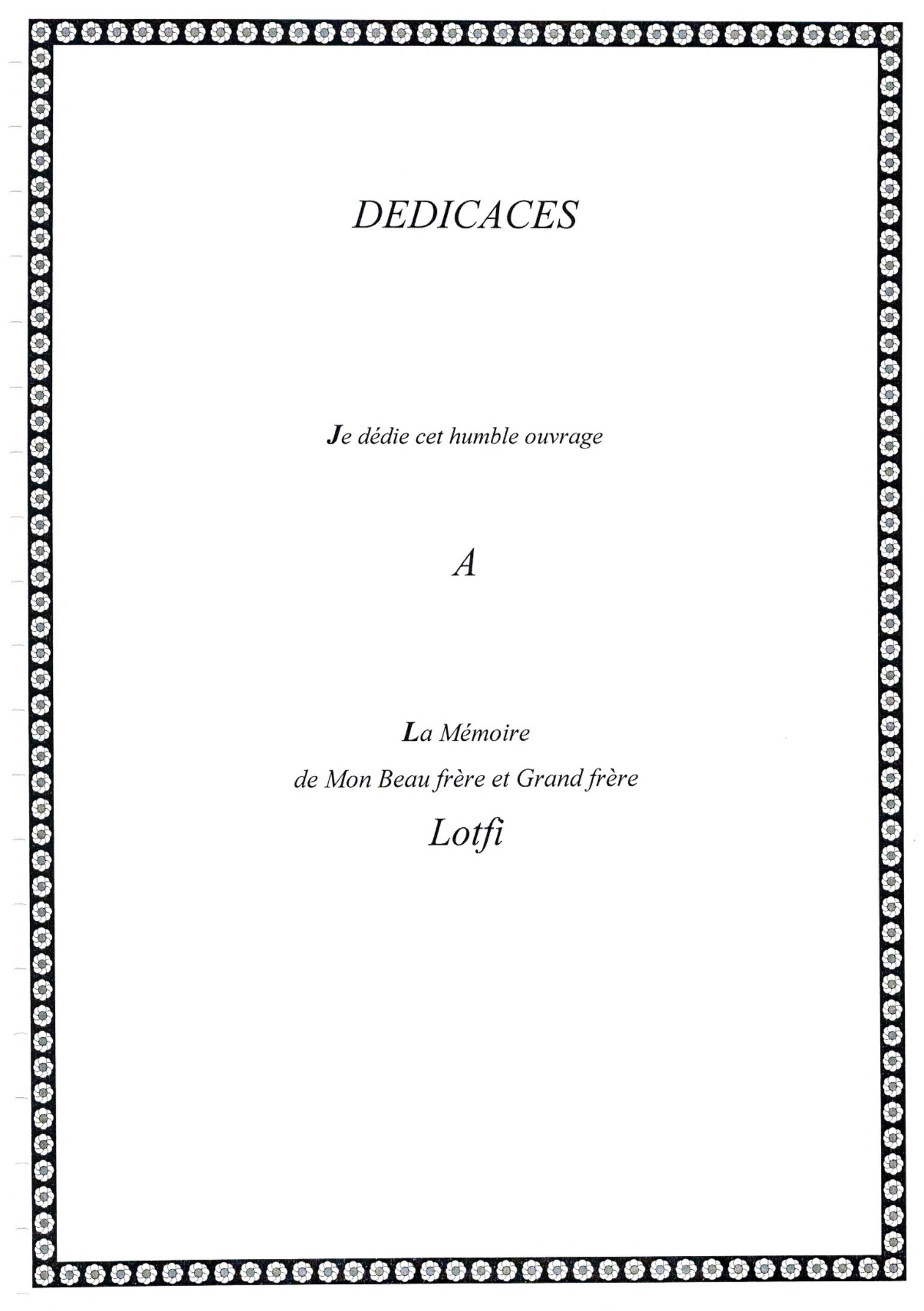
*Mr POIREL, Médecin à l'Hôpital de Bicêtre, Service de Bactériologie - Virologie pour la souche de référence PU 21 CIPR.*

*Mr HOCQUET D, Médecin à l'Hôpital Jean – Minjoz, Service de Bactériologie - Virologie pour la souche de référence V517.*

*MM DOUZI K et RAHMOUN N, Ingénieurs au Laboratoire «Antibiotiques, Antifongiques», Melle Kerbouche, Technicienne au Laboratoire «Produits naturels», Mr DIB F, Technicien au Laboratoire Central, MM AMEL S et DAHMANI A, Techniciens de Biochimie et les Techniciennes du Laboratoire «Biologie des Microorganismes et Biotechnologie».*

*Mr BENALLAL, Neurochirurgien, Mr BOUKHALFA, Responsable des Infirmiers ainsi que le Personnel Aide Soignant du Service de Neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen.*

*Mr KISSI, Traumatologue, Mr HASSAIN, Responsable des Infirmiers ainsi que le Personnel Aide Soignant du Service de Traumatologie du C.HU. de Tlemcen.*



*DEDICACES*

*Je dédie cet humble ouvrage*

*A*

*La Mémoire  
de Mon Beau frère et Grand frère*

*Lotfi*

# A

*Mes très chers Parents,  
pour leur amour, leurs encouragements et soutien moral.*

*Je les remercie d'avoir cru en mes choix  
et de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours*

*Mon frère Mohammed*

*Mes sœurs, pour m'avoir aidée à persévérer  
et à réaliser mes objectifs*

*Mes beaux-frères Hichem et Réda pour leur aide et conseils*

*Mes neveux et nièces, pour leurs encouragements*

*Mes amis Farah, Meriem, Wafaa, Amina, Yasmina,  
Asma, Rawida, Salima, Rachid et Nadjib, pour leur aide et soutien*

*L'équipe d'étudiantes de DES Microbiologie (2007),  
Latefa, Kawthar, Hanane, Karima, Naila, Hanane et Samira*

# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	1
LISTE DES TABLEAUX.....	3
INTRODUCTION .....	4

## Partie I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	5
2. BÉTALACTAMINES .....	6
2.1 CLASSIFICATION .....	6
2.2 MÉCANISME D'ACTION .....	8
3. AMINOSIDES .....	11
4. FLUOROQUINOLONES .....	12
5. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> AUX B-LACTAMINES .....	12
5.1 RÉSISTANCE NON ENZYMATIQUE .....	13
5.2 RÉSISTANCE ENZYMATIQUE PAR PRODUCTION DE B-LACTAMASES .....	15
6. PHÉNOTYPES DE RÉSISTANCE DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> AUX B-LACTAMINES.....	21
6.1 PHÉNOTYPE NON ENZYMATIQUE .....	21
6.2 PHÉNOTYPE ENZYMATIQUE .....	22
6.3 PHÉNOTYPE COMPLEXE .....	23

## Partie II : MATÉRIEL & MÉTHODES

1. MATÉRIEL .....	25
1.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE .....	25
1.2 MILIEUX DE CULTURE .....	25
1.3 TESTS BIOCHIMIQUES .....	25
1.4 SOLUTIONS ET TAMPONS .....	26
1.5 ANTIBIOTIQUES .....	26
2. MÉTHODES .....	27
2.1 PRÉLEVEMENTS .....	27
2.2 ISOLEMENT ET PURIFICATION.....	27
2.3 IDENTIFICATION.....	27
2.4 ANTIBIOGRAMME .....	28
2.5 DÉTERMINATION DES CMI EN MILIEU SOLIDE .....	30
2.6 TEST AU PABN .....	31
2.7 TEST IODOMETRIQUE.....	31
2.8 TEST À LA CLOXACILLINE.....	32
2.9 TEST DE SYNERGIE.....	33
2.10 TEST DE HODGE.....	33

2.11 TEST A L'EDTA.....	34
2.12 CONJUGAISON.....	35
2.13 EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE .....	36
2.14 ELECTROPHORESE D'ADN PLASMIDIQUE.....	37

### **Partie III : RESULTATS & DISCUSSION**

<b>1. RESULTATS .....</b>	<b>39</b>
1.1 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION .....	39
1.2 SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	39
1.3 PHENOTYPES DE RESISTANCE AUX B-LACTAMINES.....	42
1.4 RESISTANCE ASSOCIEES .....	47
1.5 TRANSFERT D'ANTIBIORESISTANCE .....	48
1.6 PLASMIDES : VISUALISATION SUR GEL D'AGAROSE .....	49
<b>2. DISCUSSION.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCES BIB LIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>55</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>66</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Classification des $\beta$ -lactamines	7
<b>Figure 2.</b> Synthèse du peptidoglycane	9
<b>Figure 3.</b> Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines	10
<b>Figure 4.</b> Mécanismes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines	12
<b>Figure 5.</b> Modification de la perméabilité : porine D <sub>2</sub>	13
<b>Figure 6.</b> Résistance par diminution de l'accumulation intrabactérienne	14
<b>Figure 7.</b> Equation générale de l'hydrolyse d'une $\beta$ -lactamine à partir d'une $\beta$ -lactamase	15
<b>Figure 8.</b> Caractéristiques générales des quatre classes de $\beta$ -lactamases	18
<b>Figure 9.</b> Organisation génétique de la céphalosporinase	19
<b>Figure 10.</b> Diagramme de détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
<b>Figure 11.</b> Schéma de Vedel	29
<b>Figure 12.</b> Lecture du test de Hodge	34
<b>Figure 13.</b> Pourcentages de résistance (R+I) des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines en Neurochirurgie	40
<b>Figure 14.</b> Pourcentages de résistance (R+I) des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux aminosides + fluoroquinolone en Neurochirurgie	40
<b>Figure 15.</b> Pourcentages de résistance (R+I) des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines en Traumatologie	41
<b>Figure 16.</b> Pourcentages de résistance (R+I) des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux aminosides + fluoroquinolone en Traumatologie	41
<b>Figure 17.</b> Distribution des phénotypes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines en Neurochirurgie	43
<b>Figure 18.</b> Distribution des phénotypes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines en Traumatologie	43
<b>Figure 19.</b> Résultat du Test au PA $\beta$ N	44
<b>Figure 20.</b> Résultat du Test iodométrique	44
<b>Figure 21.</b> Résultat du Test à la cloxacilline	45
<b>Figure 22.</b> Mise en évidence du phénotype pénicillinase + céphalosporinase	46

<b>Figure 23.</b> PU21 CIP R	<b>48</b>
<b>Figure 24.</b> Pénicillinase P108	<b>48</b>
<b>Figure 25.</b> Transconjugant 108	<b>48</b>
<b>Figure 26.</b> Visualisation des plasmides sur gel d'agarose	<b>49</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Substrats des systèmes d'efflux chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>14</b>
<b>Tableau 2.</b> Classification des $\beta$ -lactamases bactériennes	<b>17</b>
<b>Tableau 3.</b> Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines et mécanismes de résistance	<b>21</b>
<b>Tableau 4.</b> Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	<b>42</b>
<b>Tableau 5.</b> Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype pénicillinase	<b>45</b>
<b>Tableau 6.</b> Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype céphalosporinase	<b>46</b>
<b>Tableau 7.</b> Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype complexe	<b>47</b>
<b>Tableau 8.</b> Résistances associées	<b>47</b>

# INTRODUCTION

La progression des résistances bactériennes aux antibiotiques est une cause majeure d'échecs thérapeutiques en milieu hospitalier. Elle est due à l'avènement des antibiotiques en médecine où la production et l'usage en grande quantité ont contribué à la sélection des bactéries qui présentent des gènes de résistance.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste, souvent responsable d'infections nosocomiales. Du fait de ses nombreux facteurs de virulence, elle est associée à une morbidité et une mortalité élevées. Cette bactérie multirésistante aux antibiotiques, possède la particularité d'associer un niveau élevé de résistance naturelle aux bêtalactamines et différents mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques qui s'additionnent parfois dans la même souche. L'évolution de l'antibiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa*, est la conséquence de sa capacité de s'adapter aux agents antimicrobiens qui exercent leur pression de sélection.

La détection de cette résistance, dont la base génétique est la survenue de mutations et/ou l'acquisition de gènes extérieurs de résistance, est une priorité de santé publique. Elle permet de prévenir ou de ralentir la diffusion de souches multirésistantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie.

C'est dans ce cadre d'idées qu'une étude a été réalisée sur *Pseudomonas aeruginosa* au niveau des services de Neurochirurgie et de Traumatologie du C.H.U de Tlemcen selon les étapes suivantes :

- isolement et identification d'une collection de souches de *Pseudomonas aeruginosa*,
- évaluation des niveaux de résistance aux antibiotiques les plus communément utilisés : bêtalactamines, aminosides et fluoroquinolone,
- détermination des phénotypes de résistance aux bêtalactamines,
- analyse du support génétique de l'antibiorésistance.

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, du latin aeruginosus : recouvert de rouille, est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*. Elle a été découverte par Gessard en 1882 (Avril et al., 2000).

Cette bactérie, connue sous le nom de bacille pyocyanique, est un bâtonnet Gram négatif, mobile, possédant un métabolisme oxydatif (Richard, 2005) et pouvant croître en conditions anaérobiques en utilisant le nitrate en tant qu'accepteur final d'électrons (Catherine, 2003). De culture facile sur milieux usuels, elle peut se développer dans un intervalle de température allant de 4°C à 42°C (Bert, 2002). Elle produit en culture, une odeur aromatique caractéristique de seringas (Avril et al., 2000) ainsi que plusieurs différents pigments dont la pyocyanine qui donne aux colonies bactériennes une couleur bleu vert (Foca, 2002).

Grâce à sa versatilité nutritionnelle, cette espèce ubiquitaire peut croître dans des environnements hostiles au développement des autres bactéries (Prince, 2002). Elle peut survivre, en milieu hospitalier, jusque dans l'eau distillée et dans du désinfectant en solution (Salyers et Whitt, 2002).

Les épidémies hospitalières rapportées, concernent des secteurs d'activité variés et mettent en jeu divers modes de transmission: contamination des patients par l'intermédiaire de l'eau de réseau, de solutions ou de matériel médicochirurgical ou transmission manuportée (Sécher et al., 2005).

Le taux de colonisation des patients par *Pseudomonas aeruginosa* est accru par la durée d'hospitalisation, l'antibiothérapie et la diminution des défenses immunitaires (Bert, 2002). En effet, ce pathogène opportuniste ne cause aucun problème aux organismes bénéficiant d'un bon système immunitaire mais tire avantage des brèches dans l'immunité des personnes immunodéprimées (Catherine, 2003) ou ayant subi une procédure invasive (intubation, trachéotomie, cathétérisme, neurochirurgie, chirurgie oculaire) (Bert, 2002). Il est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence (de Kievit et Iglewski., 2000) qui sont, soit directement associés à sa cellule (flagelle, pili, LPS, alginate), soit excrétés dans le milieu extra-cellulaire (exotoxines, exoprotéases, hémolysines et chromophores) (Boffi El Amari, 2004 ; Richard, 2005).

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont connues pour être difficiles à traiter, en raison de sa résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques et à son extraordinaire capacité d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance en cours d'antibiothérapie (Boffi El Amari, 2004). Néanmoins, l'une des règles admises dans le traitement de ces infections est d'utiliser une association incluant un  $\beta$ -lactamine et un autre antibiotique, le plus souvent aminoside ou quinolone (Nordmann, 2003). Cette association permet de diviser par trois le risque de sélection de mutants résistants (Bedos, 2003).

## 2. Bétalactamines

Pierre angulaire des associations avec d'autres antibiotiques (Thomson et Bonomo., 2005), les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante (Rodriguez -Villalobos et Struellens., 2006). Cette famille d'antibiotiques, comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactam indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associées à un mode d'action fort complexe sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) (Cavallo et al., 2004).

### 2.1 Classification

La majorité des  $\beta$ -lactamines, dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G, sont maintenant obtenues par hémisynthèse. En fonction de leur structure chimique et de leur activité antimicrobienne, on distingue : pénames, céphèmes, monobactames, inhibiteurs irréversibles des  $\beta$ -lactamases et pénèmes (Figure 1) (Mouton et al., 2000).

#### 2.1.1 Pénames (Pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de produits, ayant en commun un cycle thiazolidine accolé au noyau  $\beta$ -lactam. Selon la nature de la chaîne latérale, six sous groupes sont individualisés : Pénicilline G, Pénicillines M (oxacilline), Aminopénicillines (amoxicilline), Carboxypénicillines (ticarcilline), Uréidopénicillines (pipéracilline) et Amidinopénicillines (pivmecillinam) (Nauciel et Vildé., 2005).

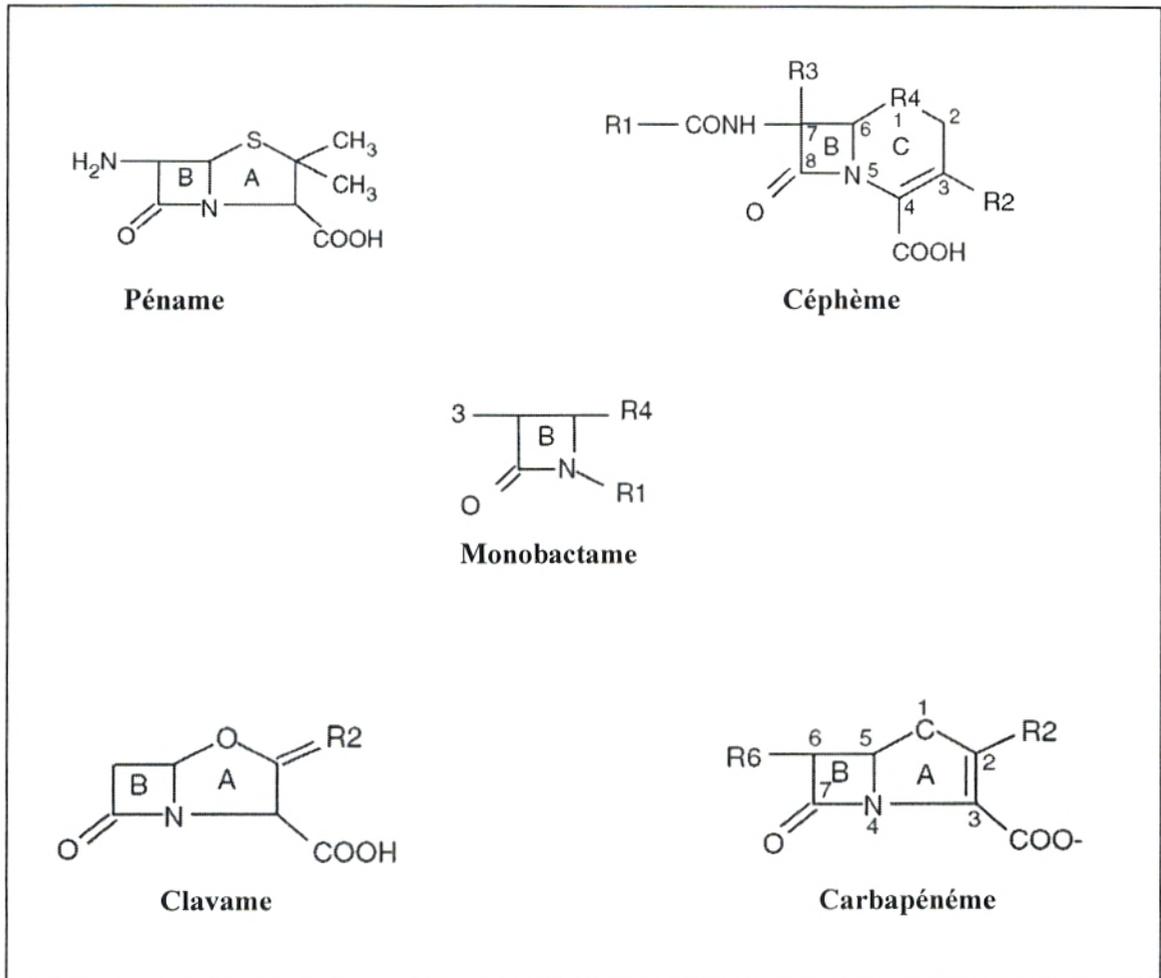


Figure 1. Classification des  $\beta$ -lactamines (Cavallo et al., 2004)

### 2.1.2 Céphèmes (Céphalosporines)

Constituées d'un noyau  $\beta$ -lactam associé à un noyau dihydrothiazine (Nauciel et Vildé., 2005), elles sont habituellement classées en générations correspondant plus à leurs propriétés antibactériennes et pharmacocinétiques qu'à un ordre chronologique (Mouton et al., 2000).

- Céphalosporines de première génération (C1G) : céfalotine
- Céphalosporines de deuxième génération (C2G) : céfuroxime
- Céphalosporines de troisième génération (C3G): céfotaxime
- Céphalosporines de quatrième génération (C4G): céfépime

### **2.1.3 Monobactames**

Ce groupe d'antibiotiques se caractérise par une structure monocyclique (noyau  $\beta$ -lactam) se différenciant ainsi du double cycle rencontré chez les pénicillines ou les céphalosporines (Le Noc, 1999). L'aztréonam, est le seul produit de ce groupe actuellement utilisé.

### **2.1.4 Inhibiteurs irréversibles de $\beta$ -lactamases**

Ce sont des  $\beta$ -lactamines à faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une  $\beta$ -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par des  $\beta$ -lactamases. L'acide clavulanique (clavame ou oxapénème), le sulbactam et le tazobactam (pénicillines sulfones), sont des inhibiteurs irréversibles de  $\beta$ -lactamases (Bergogne-Bérézin et Dellamoniaca., 1999).

### **2.1.5 Pénèmes**

Ce sont des molécules synthétiques qui se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle  $\beta$ -lactam. Trois sous groupes peuvent être individualisés : sulfopénèmes, carbapénèmes (imipénème) et oxapénèmes (Bryskier, 1999).

## **2.2 Mécanisme d'action**

Les  $\beta$ -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane. La compréhension du processus de synthèse de ce dernier a permis d'identifier ces sites d'action.

### **2.2.1 Synthèse du peptidoglycane**

Le peptidoglycane est une macromolécule réticulée composée de longues chaînes glycaniques qui sont des polymères alternés de N-acétyl glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl muramique (NAM). Des tétrapeptides sont branchés sur ces chaînes et une structure en réseau est constituée grâce à l'existence de ponts interpeptidiques (Tankovic, 2000). Sa synthèse (Figure 2) se décompose en trois phases : les précurseurs du peptidoglycane sont dans un premier temps synthétisés dans le

cytoplasme puis, après traversée de la membrane cytoplasmique, ils sont polymérisés pour former le peptidoglycane (Cavallo et al., 2004).

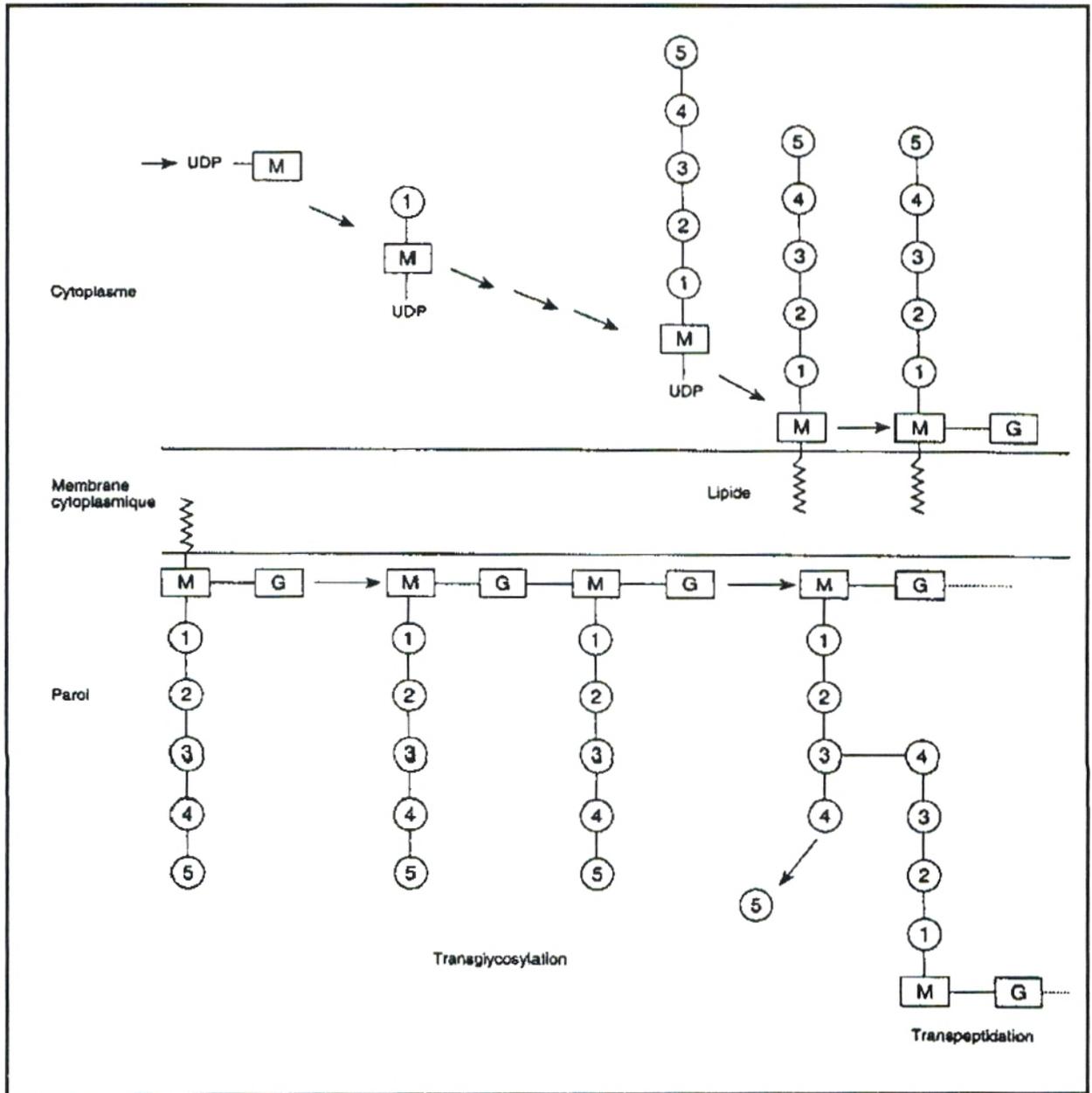


Figure 2. Synthèse du peptidoglycane (Nauciel et Vildé., 2005)

- acide aminé
- M N-acétyl muramique (NAM)
- G N-acétyl glucosamique (NAG)

La polymérisation s'effectue en deux étapes : la première fait intervenir une transglycosylase pour former des chaînes de glycane, la seconde réaction, catalysée par les transpeptidases, crée une liaison covalente entre peptides portés par des chaînes de glycane voisines. Elle conduit donc à la formation de ponts interpeptidiques assurant la réticulation du peptidoglycane (Charlier et al., 1998). Cette réaction de transpeptidation libère la D-Ala terminale du pentapeptide et forme un pont entre la D-Ala subterminale et le dernier acide aminé d'une chaîne peptidique secondaire appartenant à un autre précurseur (Tankovic et Duval., 1997 ; Tankovic, 2000). D'autres enzymes comme les carboxypeptidases sont susceptibles d'interférer avec la transpeptidation en coupant la liaison entre D-Ala 4 et la D-Ala 5. Ils auraient ainsi un rôle dans la régulation de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al., 2004).

### 2.2.2 Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamines présentent une analogie structurale entre le noyau  $\beta$ -lactam et le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du pentapeptide constitutif du peptidoglycane (Figure 3).

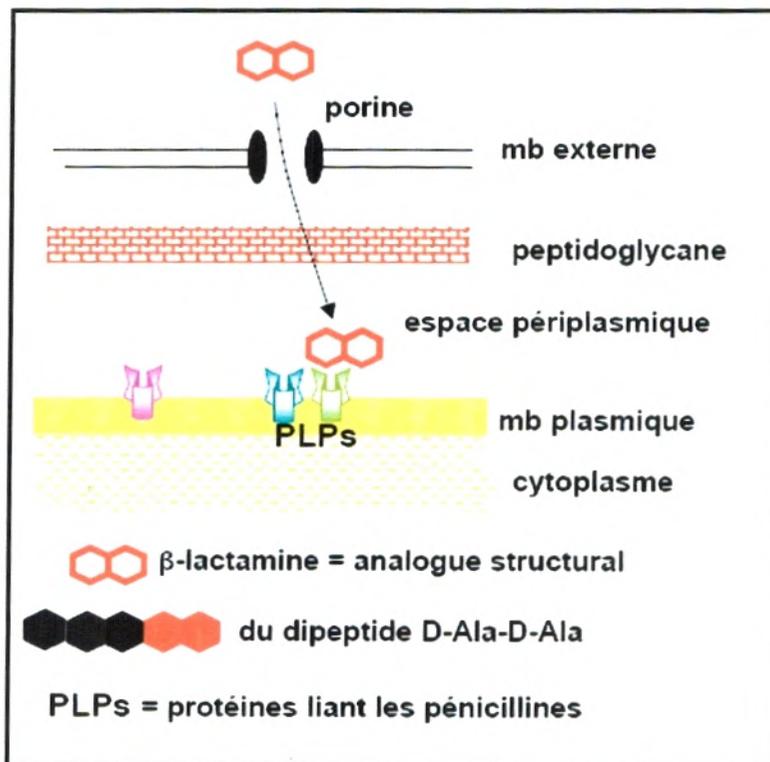


Figure 3. Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines (Verdet, 2007)

Leur reconnaissance par les transpeptidases et les carboxypeptidases (PLP) aboutit à la fixation du cycle  $\beta$ -lactam sur le site actif de ces enzymes cibles. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle  $\beta$ -lactam par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent ( $EI^*$ ) qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne (Livermore, 1995)



L'effet direct de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane dû aux  $\beta$ -lactamines est l'arrêt de la croissance bactérienne, ou effet bactériostatique. Cependant ces antibiotiques ont un effet bactéricide (Tankovic, 2000). Cet effet résulte de la dégradation du peptidoglycane par des autolysines conduisant à une lyse de la bactérie (Gautier, 2007).

### 3. Aminosides

Ce sont des antibiotiques à large spectre, utilisés en thérapeutique depuis la découverte de la streptomycine par Waksman en 1944 (Bryskier, 1999). Ces antibiotiques, typiquement bactéricides, incluent l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, la néomycine et la tobramycine (Singleton, 1999). Ils ont pour principale cible le ribosome dont ils perturbent le fonctionnement (Gaudy et Buxeraud, 2005). Leurs effets comprennent non seulement la production de protéines défectives, mais aussi des altérations des enveloppes bactériennes et des dégradations de l'ARN (Doublet, 2004). L'action de ces antibiotiques est rendue caduque chez *Pseudomonas aeruginosa*, soit par la surexpression constitutive de la pompe d'efflux «Mex XY» (Boffi El Amari, 2004), soit par des enzymes inactivatrices dont les gènes sont situés sur des plasmides autotransférables ou sur des transposons (Mimoz, 2003).

#### 4. Fluoroquinolones

Depuis l'introduction des fluoroquinolones en thérapeutique en 1980, l'utilisation de cette classe d'antibiotiques a rapidement augmenté jusqu'à devenir l'une des plus utilisées pour différents types d'infections bactériennes (Zhanel et al., 2004). La ciprofloxacine est la seule molécule active de cette classe d'antibiotiques contre *Pseudomonas aeruginosa*, elle est utilisée en association avec une  $\beta$ -lactamine lorsqu'un aminoside est contre indiqué (Bedos, 2003). Elle agit par inhibition de la synthèse de l'ADN, qui est suivi rapidement de la mort bactérienne (Tankovic et Duval, 1997). La résistance à cette classe d'antibiotiques est médiée par divers mécanismes dont les pompes à efflux qui sont capables d'expulser ces molécules hors de la cellule (Boffi El Amari, 2004). Leur activation précède généralement la mutation de la cible, essentiellement l'ADN-gyrase, qui est le mécanisme de résistance le plus connu chez *Pseudomonas aeruginosa* pour les fluoroquinolones (Mesaros et al., 2007).

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

Le bacille pyocyanique dispose pour contrer l'efficacité des  $\beta$ -lactamines d'une quinzaine de systèmes connus à ce jour (Rio et al., 2002). Il peut s'agir de système d'efflux ou d'imperméabilité, éventuellement associés (Nordmann, 2003) ou de production de  $\beta$ -lactamases acquises et/ou surproduction constitutive de céphalosporinase AmpC (Figure 4) (Cavallo, 2002).

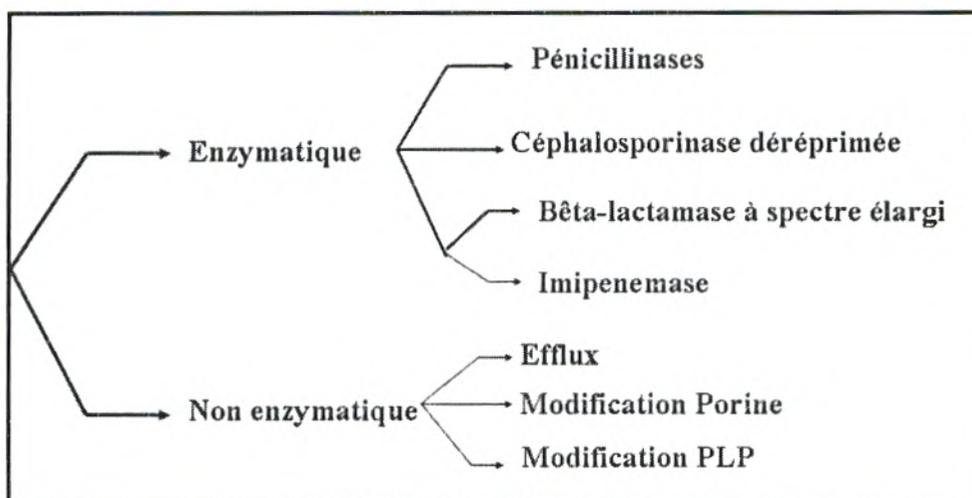
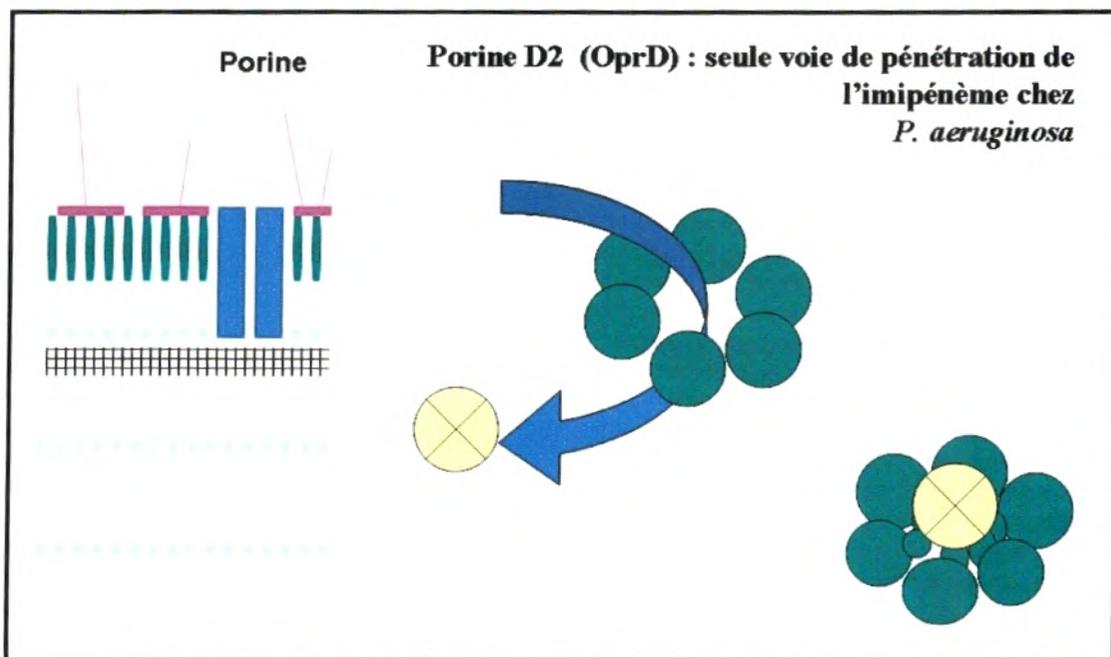


Figure 4. Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines (Ruimy, 2003)

## 5.1 Résistance non enzymatique

### 5.1.1 Imperméabilité de la membrane externe

La pénétration des  $\beta$ -lactamines à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est assurée par diffusion à travers des canaux protéiques. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, Il a été démontré que la perméabilité membranaire est 10 à 100 fois moins efficace que chez *Escherichia coli* (Ochs et al., 1999), du fait du nombre restreint de porines fonctionnelles. Cette imperméabilité s'exprime par une résistance naturelle à certaines  $\beta$ -lactamines dont le céfotaxime et le Moxalactam (Nordmann, 2003 ; Vedel, 2005). La résistance acquise aux carbapénèmes par imperméabilité membranaire, survient suite à la perte ou à la diminution de la porine spécifique OprD<sub>2</sub> (Figure 5). Elle se traduit par une résistance à l'imipénème et une diminution de sensibilité au méropénème (Livermore, 2002).



**Figure 5. Modification de la perméabilité : porine D<sub>2</sub>**  
(Aubert et Carricajo., 2005)

La résistance à l'imipénème est associée à une hydrolyse partielle par la céphalosporinase naturelle, alors que le méropénème, beaucoup plus stable à l'hydrolyse par cette AmpC (Poirel, 2006), peut également emprunter une voie alternative, si celle-ci est absente ou en quantité réduite (Sinave, 2003)

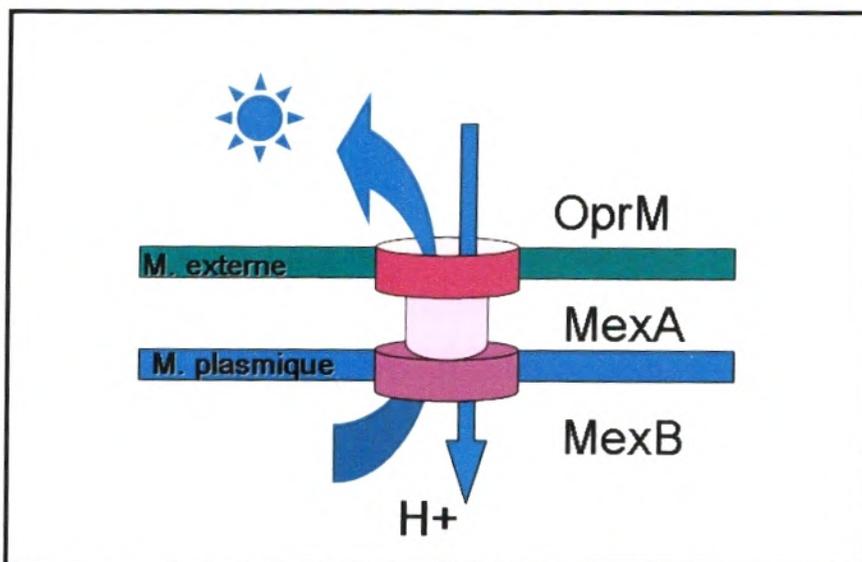
### 5.1.2 Pompes d'efflux

Les pompes d'efflux constituent un mécanisme de défense essentiel pour *Pseudomonas aeruginosa* contre les antibiotiques et les antiseptiques. Sept systèmes (Tableau 1), dont MexAB-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN, ont déjà été caractérisés chez cette espèce (Hocquet et al., 2004).

**Tableau 1. Substrats des systèmes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* (Cattoir., 2004)**

Système	Substrats (Antibiotiques)
MexAB-OprM	Fluoroquinolone, Ticarcilline, Aztréonam, Tétracycline ...
MexXY/OprM	Fluoroquinolone, Aminosides, Céfépime, Cefpirome, Tétracycline
MexCD-OprJ	Fluoroquinolone, Cefpirome, Céfépime, Chloramphénicol ...
MexEF-OprN	Fluoroquinolone, Imipénème, Triméthoprim, Chloramphénicol ...
MexGHI-OpmD	Fluoroquinolone ...
MexJK/OprM	Tétracycline, Erythromycine ...
MexVW/OprM	Fluoroquinolone, Chloramphénicol, Tétracycline, Erythromycine

Ils sont constitués de trois protéines (Figure 6), la CMP (Cytoplasmic Membrane Protein), située dans la membrane interne et responsable de l'efflux proprement dit, et de deux autres protéines, la première située au niveau de la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein) et la deuxième (MFP : Membrane Fusion Protein) assurant la jonction entre les deux membranes (Mesaros et al., 2005). Ces systèmes d'efflux expulsent des antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique (Poirel, 2006).

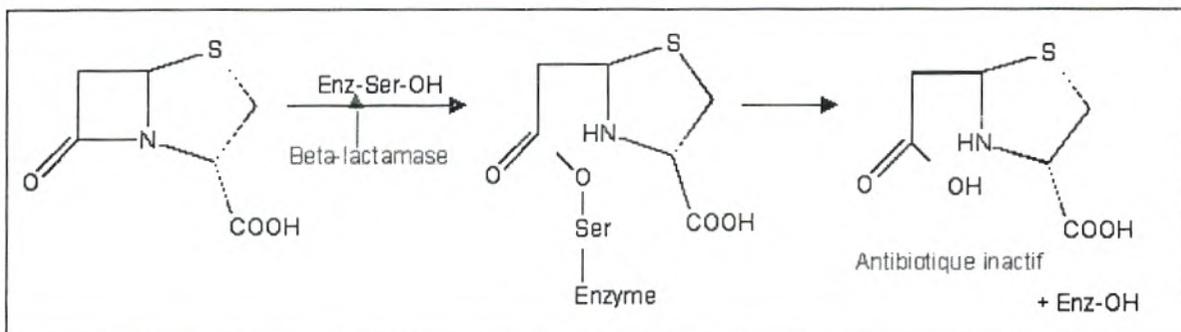


**Figure 6. Résistance par diminution de l'accumulation intrabactérienne (Aubert et Carricajo., 2005)**

Le système d'efflux MexAB-OprM, d'expression constitutive (Boffi El Amari, 2004), est la principale composante de la résistance intrinsèque de *Pseudomonas aeruginosa* à plusieurs antibiotiques (Sinave, 2003). Sa surexpression se traduit par une augmentation de la CMI de toutes les  $\beta$ -lactamines, imipénème excepté, mais dans des proportions très variables selon les molécules (Bert, 2002). Les systèmes MexC-MexD-OprJ et MexE-MexF-OprN sont, quant à eux, exprimés que s'il existe des mutations (Schweizer, 2003). L'expression de MexE-MexF-OprN est co-régulée à une diminution d'expression de la porine OprD<sub>2</sub> (Livermore, 2002).

## 5.2 Résistance enzymatique par production de $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases constituent le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (Philippon et Arlet., 2006). Ces enzymes bactériennes, catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactam (Figure 7) (Bryskier, 1999) en suivant une cinétique similaire à celle des PLPs avec les  $\beta$ -lactamines (Kazmierczack, 1999).



**Figure 7. Equation générale de l'hydrolyse d'une  $\beta$ -lactamine à partir d'une  $\beta$ -lactamase (Barrial et Scotet., 2006)**

Dans certains cas où l'affinité de l'enzyme pour l'antibiotique est faible, les  $\beta$ -lactamases, grâce à une surproduction, peuvent rendre l'antibiotique inactif en le séquestrant sans hydrolyse l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible (Tichat, 1995).

Les gènes qui codent pour ces enzymes peuvent être de localisation chromosomique ou extra-chromosomique, portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons (Liassine, 2000). La présence de ces gènes sur les éléments génétiques transférables facilite leur transfert horizontal entre espèces phylogénétiquement éloignées (Therrien,

1998 ; Charlier et al., 1998). La conjugaison est le mécanisme le plus fréquent dans la dissémination des gènes (Ehlers et Bouwer., 1999). Elle est impliquée dans le transfert horizontal des plasmides et des transposons (Doublet, 2004).

La grande diversité de ces enzymes d'inactivation a suscité, depuis 1945, la publication d'articles visant à les classer (Labia, 1999). Quatre majeures classifications ont été proposées (Tableau 2) par Richmond et Sykes, Ambler, Mitsuhashi et Inoue, Bush-Jacoby et Meideros (Bush et al., 1995).

Tableau 2. Classification des  $\beta$ -lactamases bactériennes (Bush et al., 1995)

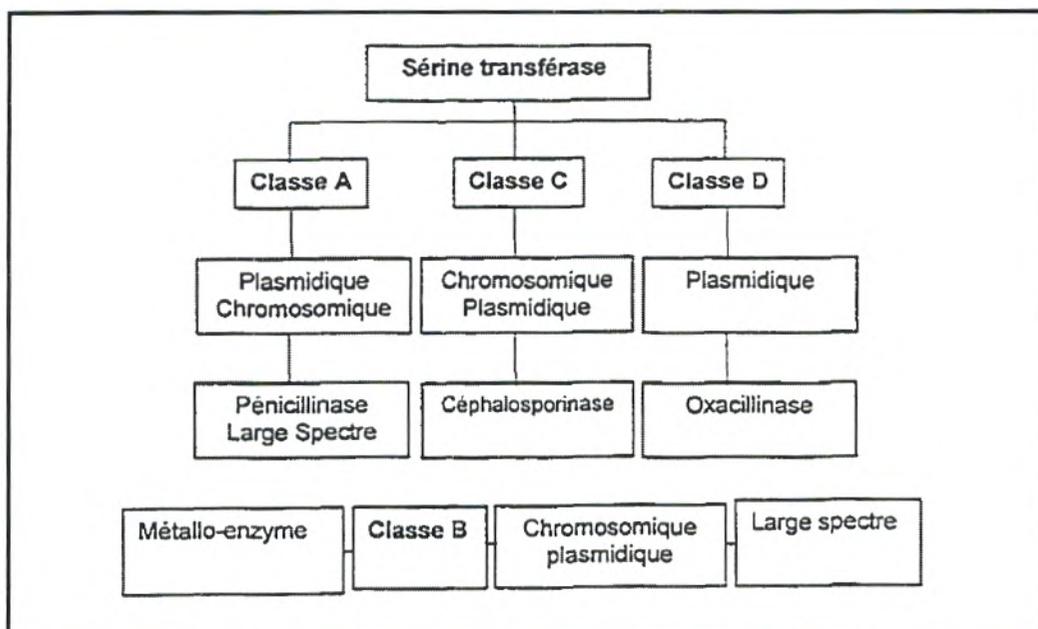
Bush-Jacoby-Meideros group	1989 Bush group	Richmond-Sykes class	Mitsubishi-Inoue type	Molecular class (Ambler)	Preferred substrates	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from Gram negative bacteria ; MIR
2a	2a	Not included	PCase V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

CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase.

CA, clavulanic acid

Nd, not determined

Parmi ces classifications, le système d'Amblar a été mondialement adopté (Kong et al., 2005). Fondé sur l'homologie de séquence en acides aminés (Amblar, 1980) il divise les  $\beta$ -lactamases en 4 groupes (de A à D) (Figure 8). Les groupes A, C et D contiennent des  $\beta$ -lactamases avec la sérine dans le site actif, alors que le groupe B contient des enzymes comportant deux atomes de zinc au site actif. (Rodriguez - Villalobos et struelens., 2006). La classe A est la plus diversifiée (Therrien, 1998). Elle comprend les enzymes, de type CARB, PER et TEM rapportées chez *Pseudomonas aeruginosa* (Weldhagen et al., 2003). Les enzymes de classe C correspondent à la céphalosporinase chromosomique de cette espèce alors que celles de classe D, généralement médiées par des plasmides ou des transposons, sont représentées par les oxacillinases (Kong et al., 2005). Les  $\beta$ -lactamases de classe B sont désignées comme métallo-enzymes et peuvent hydrolyser les carbapénèmes (Nordmann et Poirel., 2002).



**Figure 8. Caractéristiques générales des quatre classes de  $\beta$ -lactamases (Amblar, 1980)**

La résistance enzymatique naturelle de *Pseudomonas aeruginosa* est le fait de la production de deux  $\beta$ -lactamases chromosomiques. L'oxacillinase OXA 50 (classe D) d'expression constitutive et dont la contribution au phénotype de résistance naturelle ne semble pas significative et la céphalosporinase AmpC (classe C) d'expression

d'expression inductible (Girlich et al, 2004 ; Poirel, 2006). L'induction de cette  $\beta$ -lactamase, qui se produit après exposition à certaines  $\beta$ -lactamines (Hancock et Speert., 2000), se traduit par une augmentation transitoire et réversible de la production enzymatique (Tichat, 1995). L'organisation génétique de cette céphalosporinase fait intervenir 5 gènes : *ampC*, *ampD*, *ampR*, *ampG* et *ampE* (Figure 9) (Arlet et Philippon., 1997). Le gène *ampC*, codant pour la  $\beta$ -lactamase, est précédé par le gène régulateur *ampR* (Gautier, 2007).

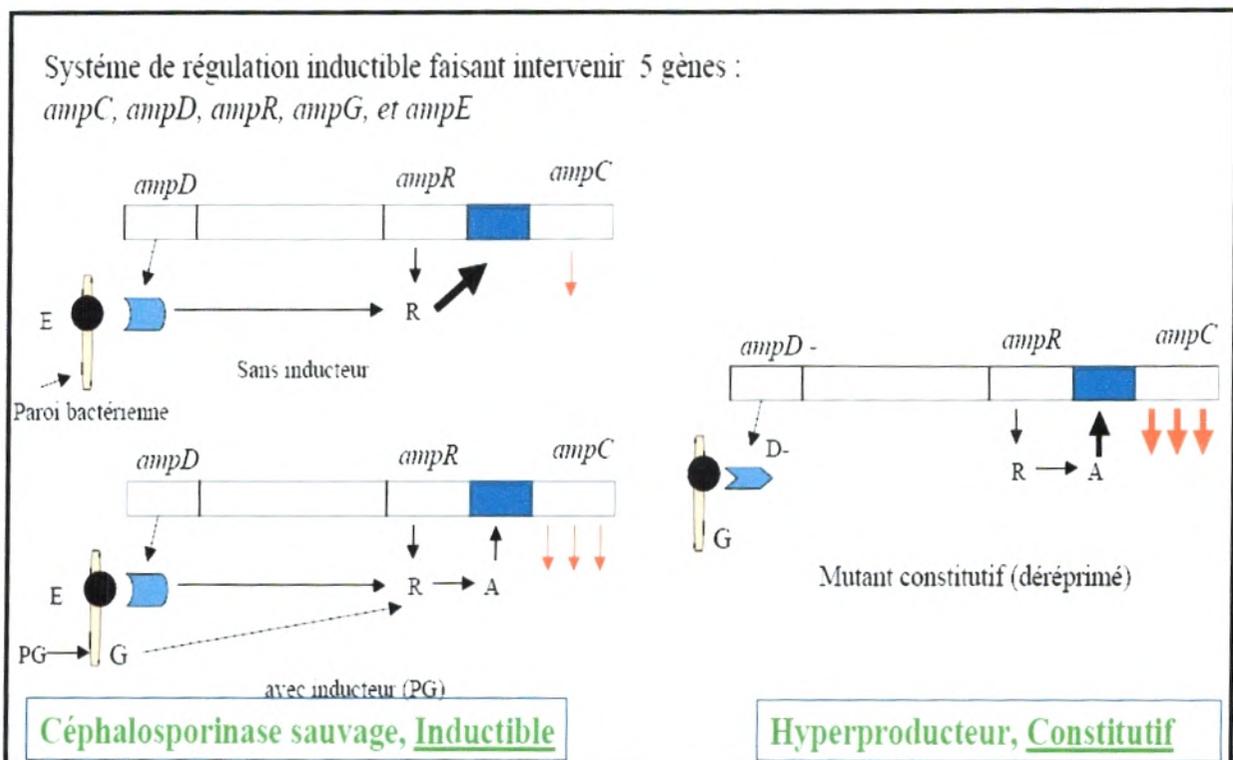


Figure 9. Organisation génétique de la céphalosporinase (Ruimy, 2003)

Au cours d'une antibiothérapie, les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactam peuvent sélectionner des souches mutantes qui surexpriment la céphalosporinase en absence d'inducteur (Langae et al., 2000). Ceci est dû à l'inactivation du gène *ampD* qui, chez *Pseudomonas aeruginosa*, résulte seulement en une dérepression partielle de la  $\beta$ -lactamase avec une fréquence de  $10^{-7}$ , alors que la dérepression totale requiert d'autres mutations et se produit à une fréquence de  $10^{-9}$  (Hancock et Speert., 2000).

La résistance enzymatique acquise du pyocyanique, peut également résulter de l'expression de  $\beta$ -lactamases qui possèdent une grande affinité pour les pénicillines (Prince, 2002). Il s'agit de carbénicillinases (groupe CARB ou PSE), d'oxacillinases (OXA) ou plus rarement de pénicillinases du groupe TEM (Bert, 2002). Ces  $\beta$ -lactamases ont évolué parallèlement à l'utilisation massive des  $\beta$ -lactamines en thérapeutique, vers la diversification et l'élargissement de leur spectre d'activité (Rodriguez -Villalobos et struelens., 2006). Des mutations ponctuelles dans la séquence génétique du site actif de ces pénicillinases (classe A et D) (Bradford, 2001 ; Paterson et al., 2005), entraînant une meilleure activité pour les céphalosporines de troisième génération (Philippon et Arlet., 2006), ont donné naissance aux  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). Parmi celles de classe A, TEM-4, TEM-24, TEM-42 et SHV-2a ont été rapportées chez *Pseudomonas aeruginosa*. Celles de classe D, sont OXA-18 et les dérivés de OXA-2 et OXA-10 (De Champs et al., 2002). Les autres BLSE émergentes chez cette espèce, sont d'origine inconnue (Bert, 2002) et constituent une nouvelle structure sur le plan moléculaire (Bradford, 2001). Elles sont représentées par les PER-1, PER-2, VEB-1, GES-1 et BEL-1 (Poirel, 2006 ; Arlet et Philippon., 2003). Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique et ont en général le même substrat que TEM et SHV (Bradford, 2001). Ges-2, décrite en 2000 en Afrique du Sud, dérive par mutation de GES-1 (Arlet et Philippon., 2003). Elle possède une activité étendue aux carbapénèmes dont la conséquence en termes de résistance à l'imipénème est tout à fait significative (Poirel, 2006). A la différence de ces enzymes, les  $\beta$ -lactamases de classe B, induisent une résistance à haut niveau à toutes les  $\beta$ -lactamines, excepté l'aztréonam (Livermore et Woodford., 2000), leur support génétique est situé au sein d'intégrons en position plasmidique ou chromosomique (Bert, 2002). Ces métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) ont émergé depuis une dizaine d'année chez *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon et Arlet., 2006). Trois groupes peuvent y être distingués, le plus important étant composé du groupe IMP, suivi du groupe VIM (Livermore et Woodford., 2000 ; Nordmann et Poirel., 2002) et le dernier, composé d'un seul représentant, SPM-1 (Murphy et al., 2003).

## 6. Phénotypes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux $\beta$ -lactamines

L'émergence de souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux  $\beta$ -lactamines antipyrocyaniques pose un réel problème thérapeutique. Seule une connaissance actualisée des mécanismes de résistance développés par cette bactérie (Tableau 3) permet de réaliser la lecture interprétative (Weber, 2003), qui est une caractérisation des phénotypes de résistance par des épreuves de sensibilités à des antibiotiques sélectionnés non seulement dans une optique thérapeutique mais également comme marqueurs de détection phénotypique (Sinave, 2003).

**Tableau 3. Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et mécanismes de résistance (Nordmann, 2003)**

	Pénicillinase	Céphalosporinase hyperproduite	BLSE	Carbapénémase	Efflux (OprM)	Perte OprD
<b>Ticarcilline</b>	R	R	R	R	I	S
<b>Pipéracilline + tazobactam</b>	I/S	R	S	R	S	S
<b>Ceftazidime</b>	S	I/R	R	R	S	S
<b>Céfépime</b>	S	I	R	R	I/S	S
<b>Imipénème</b>	S	S	S	R	S	R

### 6.1 Phénotype non enzymatique

#### 6.1.1 Résistance isolée à l'imipénème

Ce phénotype de résistance, est similaire au phénotype sauvage à l'exception d'une diminution voire absence d'une zone d'inhibition sur antibiogramme et un passage de CMI de 1-2 à 8-32  $\mu\text{g/ml}$  pour l'imipénème (Livermore, 2001).

#### 6.1.2 Système d'efflux actif

La surexpression du MexAB-OprM se traduit par une résistance ou une diminution de la sensibilité à la ticarcilline, à l'aztréonam et au céfotaxime (Nordmann, 2003) alors que la sensibilité à la pipéracilline et à la ceftazidime est conservée. L'expression de MexC-MexD-OprJ entraîne une multirésistance caractérisée phénotypiquement par une diminution de la sensibilité au céfépime et au cefpirome (Cattoir, 2004), celle du

MexE-MexF-OprN entraîne une résistance aux fluoroquinolones et à l'imipénème (Livermore, 2002).

## 6.2 Phénotype enzymatique

### 6.2.1 Céphalosporinase

La céphalosporinase naturelle de *Pseudomonas aeruginosa* induit une résistance à l'amoxicilline, à l'acide clavulanique et aux céphalosporines de première et deuxième génération, céfalotine et céfoxitine notamment (Poirel et al., 2001). L'hyperproduction de cette enzyme s'exprime par une résistance aux céphalosporines de troisième génération, l'absence de synergie avec l'acide clavulanique et une sensibilité conservée au céfépime et au cefpirome (Arlet et Philippon., 2003). Ces enzymes sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique, mais le sont cependant, par la cloxacilline (Shahid et al., 2004).

### 6.2.2 Pénicillinase acquise

Par rapport aux souches sauvages, les pénicillinases entraînent une résistance supplémentaire aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux uréidopénicillines (pipéracilline) et à la cefsulodine. Les pénicillinases à large spectre sont différenciées de celles à spectre restreint par une résistance plus élevée aux antibiotiques cités (Vedel, 2005).

### 6.2.3 Bêtalactamase à spectre étendu

Le phénotype BLSE se caractérise par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam (Bradford, 2001). Il se traduit par une CMI > à 64 µg/ml vis-à-vis de la ceftazidime (Livermore et Brown., 2001) et une image de synergie, en forme d'un bouchon de champagne, entre un disque d'augmentin (AMC) et celui d'une céphalosporine de troisième génération (Larabi et al., 2003).

#### 6.2.4 Carbapénémase

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ayant acquis ce type d'enzymes, expriment une résistance à haut niveau à toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception de l'aztréonam qui n'est pas un antipyocyanique majeur (Nordmann, 2003). L'inhibition de ces enzymes par des chélateurs d'ions comme l'EDTA et non par les inhibiteurs classiques de  $\beta$ -lactamases, permet d'individualiser ce phénotype de résistance (Bush et al., 1995).

#### 6.3 Phénotype complexe

Plusieurs mécanismes de résistance acquise (deux ou plus) peuvent coexister dans la même souche de *Pseudomonas aeruginosa* et donner un phénotype complexe. Il est possible d'interpréter ce phénotype en combinant l'effet de chaque mécanisme isolé (Figure 10) (Vedel, 2005).

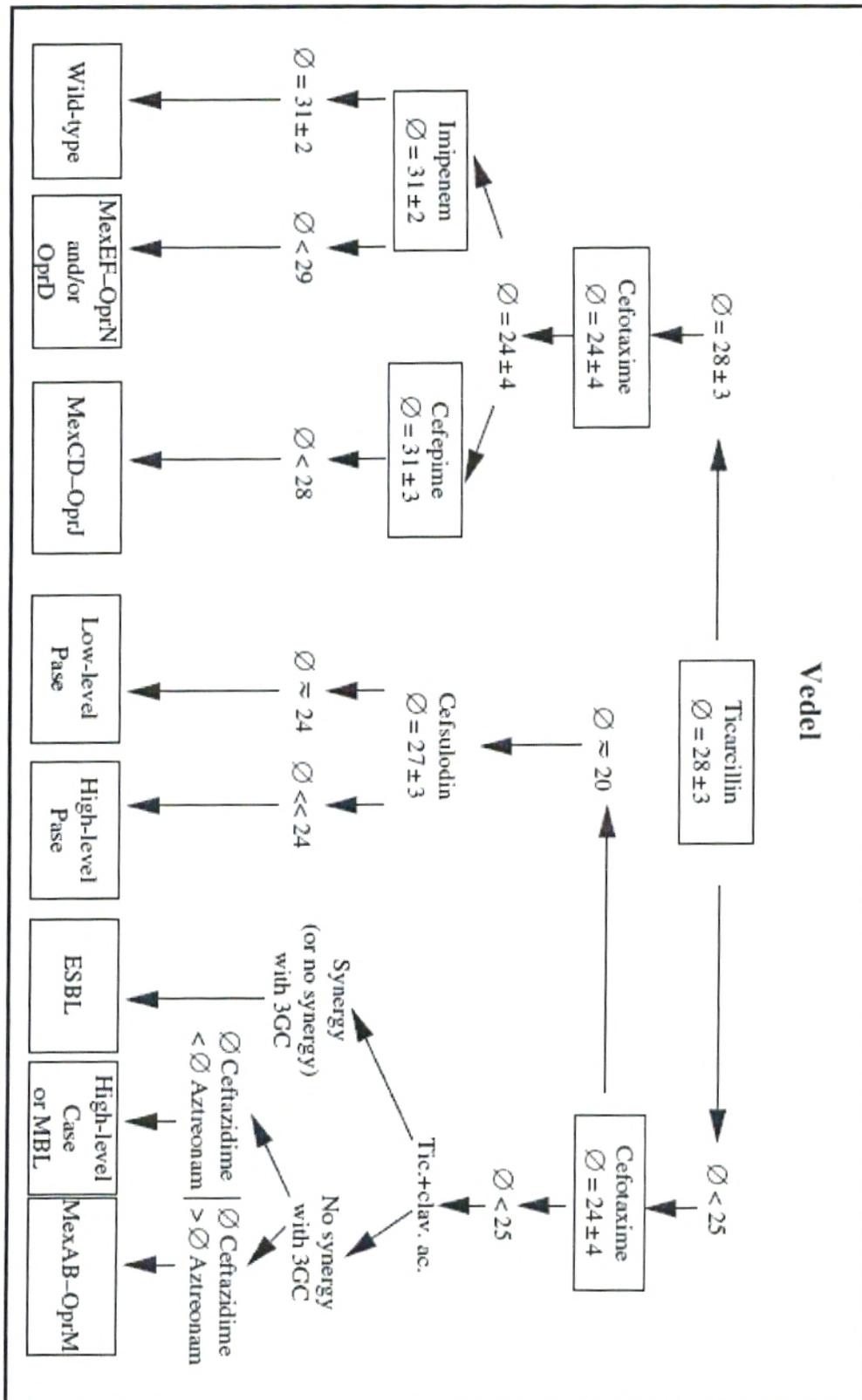


Figure 10. Diagramme de détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* (Vedel, 2005)

- Ø: diamètre
- Case: céphalosporinase
- Pase: pénicillinase
- ESBL: bêta-lactamase à spectre élargi
- MBL: métallobêta-lactamase

PARTIE II

MATERIEL & METHODES

## **1. Matériel**

### **1.1 Matériel biologique**

#### **1.1.1 Souches étudiées**

95 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au niveau des services de Neurochirurgie et de Traumatologie du C.H.U de Tlemcen ont fait l'objet de notre étude.

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

- ATCC 27853
- ATCC 25922
- PU 21 Cipro R
- VP517
- pbR 322 et pkr 2013

### **1.2 Milieux de Culture**

#### **1.2.1 Milieux de culture liquide**

- Bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur d'Algérie)
- Bouillon Cœur cerveau (BHIB) (Fluka)
- Bouillon Luria (LB) (Sigma)

#### **1.2.2 Milieux de culture solide (Fluka)**

- Gélose nutritive
- Mac Conkey
- Mueller Hinton.

### **1.3 Tests biochimiques**

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

### **1.4 Solutions et Tampons (Annexes 5, 6 et 7)**

- Tampon phosphate 0,5 M pH 7
- Solution iodo-iodurée
- Tampon TE
- Solution de lyse
- Phénol-Chloroform-Isoamylalcool (24 : 25 :1) (Sigma)
- Tampon TBE 1X
- Tampon de charge
- Solution de BET (Sigma)

### **1.5 Antibiotiques**

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

Ticarcilline (75 µg), Ticarcilline + Acide Clavulanique (75/10 µg), Pipéracilline (75), Pipéracilline + Tazobactam (75/10 µg), Imipénème (10 µg), Aztréonam (30 µg), Céfotaxime (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Céfopérazone (30 µg), Cefsulodine (30 µg), Céfépime (30 µg), Moxalactam (30 µg), Tobramycine (10 µg), Amikacine (30 µg), Gentamicine (15 µg) et Ciprofloxacine (5 µg).

#### **1.5.2 En poudre**

Ticarcilline (Glaxo Smith Kline), Ticarcilline + Acide Clavulanique (Glaxo Smith Kline), Pipéracilline (Dakota<sup>R</sup> Pharm), Pipéracilline + Tazobactam (Wyeth Pharmaceuticals), Cloxacilline (astellas), Imipénème (MSD), Aztréonam (Sanofi-Synthelabo), Céfotaxime (Aventis), Ceftazidime (Glaxo Smith Kline), Céfépime (Bristol-Myers Squibb), Tobramycine (Merck), Amikacine (Bristol-Myers Squibb), Gentamicine (Panpharma) et Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

## **2. Méthodes**

### **2.1 Prélèvements**

Les prélèvements sont effectués par écouvillonnage sur des plaies post-opératoires infectées, puis acheminés au laboratoire pour être incubés 18 à 24 heures dans du bouillon nutritif.

### **2.2 Isolement et Purification**

L'isolement est réalisé sur gélose nutritive supplémentée de 0,02% de cétrimide (Sigma) et incubé 48 heures à 37° C (Crespo et al., 2004). Les colonies présentant une pigmentation verte ou rose sont repiquées sur le même milieu pendant 48 heures à 37° C puis sur Mac Conkey 24 heures à 42° C.

### **2.3 Identification**

L'identification est réalisée par Galerie API 20NE et test d'oxydase.

#### **2.3.1 Galerie API 20NE**

La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 1), et l'identification obtenue à l'aide du tableau d'identification du catalogue analytique (Annexe 2).

#### **2.3.2 Test d'oxydase (Marchal et al., 1987)**

Ce test est réalisé en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique. Une réaction positive se traduit par une coloration violette en 2 minutes environ.

## 2.4 Antibiogramme (CASFM 2006 ; Vedel 2005)

### 2.4.1 Principe

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistant) et d'orienter le traitement antibiotique. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

### 2.4.2 Technique

#### Préparation de L'inoculum

- Pour chacune des souches à tester, réaliser une suspension en ensemencant 5 ml de bouillon BHIB par 3 à 4 colonies de morphologie similaire à partir d'un milieu non sélectif
- Incuber 3 à 5 heures sous agitation à 37° C. La culture obtenue doit être de 10<sup>8</sup> UFC/ml soit de densité optique 0,08 – 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm.

#### Ensemencement

- Diluer la suspension inoculum au 1/100 ( $\approx 10^6$  UFC/ml) dans de l'eau physiologique
- Ensemencer par inondation, en respectant les mesures de sécurité nécessaires, les boîtes de Pétri préalablement coulées par 20 ml de milieu Mueller Hinton
- Rejeter l'excès puis sécher les boîtes 20 à 30 minutes à l'étuve.

#### Application des disques

- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile.

Pour ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines, placer les disques dans un ordre qui obéit au schéma de Vedel (Figure 11).

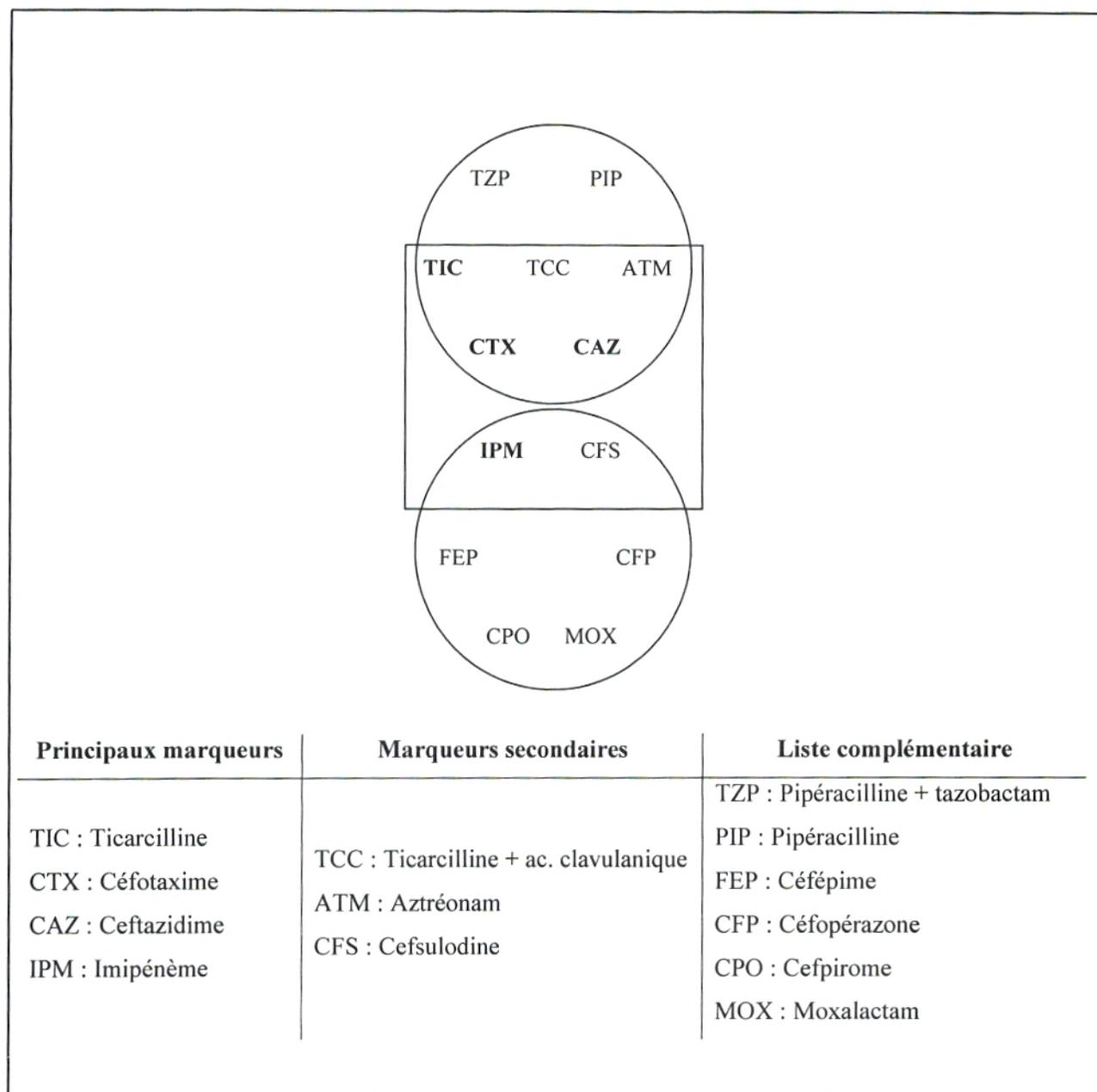


Figure 11. Schéma de Vedel (2005)

### 2.4.3 Lecture

- Après 18 à 24 heures d'incubation, mesurer les diamètres d'inhibition et se référer aux valeurs critiques (Annexe 3)
- Interpréter les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

## **2.5 Détermination des CMI en milieu solide (CASFM 2006)**

### **2.51 Principe**

La méthode de dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

### **2.5.2 Technique**

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

Pour chacun des antibiotiques, préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions sériées de progression géométrique de raison 1/2 (Annexe 4).

#### **Préparation des boîtes**

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri ainsi que 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin.
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton gélosé maintenu en surfusion
- Bien mélanger et laisser solidifier
- Sécher les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37° C.

#### **Préparation de L'inoculum**

Préparer des suspensions de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester.

#### **Ensemencement**

- Diluer la suspension inoculum au 1/10
- Ensemencer par spot 1 à 2 µl de la suspension bactérienne, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

#### **Incubation**

Incuber 18 à 24 heures à 37° C.

### 2.5.3 Lecture

- S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin
- La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

## 2.6 Test au PA $\beta$ N (Lomovskaya et al., 2001)

### 2.6.1 Principe

Il consiste à mettre en évidence l'inhibition du système d'efflux MexAB-OprM par le phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) (Sigma).

### 2.6.2 Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant du PA $\beta$ N à une concentration finale de 25  $\mu$ g/ml.

### 2.6.3 Lecture

Une augmentation des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques substrats indique un résultat positif.

## 2.7 Test iodométrique (Courvalin et al., 1985)

### 2.7.1 Principe

Il consiste en une décoloration du complexe iode-amidon due à la réduction de l'iode par l'acide pénicilloïque issu de l'hydrolyse de la pénicilline G par les  $\beta$ -lactamases.

### 2.7.2 Technique

#### Préparation du gel

- Dissoudre, par chauffage jusqu'à ébullition, 0,3 g d'amidon et 0,8 g d'agarose dans 50 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7

- Refroidir la solution au bain Marie à une température de 55° C
- Ajouter 1,2 ml de solution iodo-iodurée et 30 mg de Pénicilline G
- Bien mélanger, verser dans des boîtes de Pétri puis laisser solidifier
- Réaliser des puits de 4 à 5 mm de diamètre séparés d'environ 3 cm.

### **Préparation de la suspension bactérienne**

Ensemencer, à partir d'une culture de 18 heures sur boîte de la souche à étudier, 4 à 5 colonies dans 0,5 ml d'eau physiologique puis vortexer.

### **Ensemencement**

Remplir les puits du gel de 20 µl de la suspension bactérienne préparée extemporanément.

### **2.7.3 Lecture**

L'activité enzymatique se traduit par une zone décolorée qui apparaît autour des puits.

## **2.8 Test à la cloxacilline (De Champs et al ., 2002)**

### **2.8.1 Principe**

La cloxacilline est un antibiotique qui permet d'inhiber les β-lactamases de type AmpC. La restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, céfotaxime) en présence d'une concentration définie de cloxacilline, permet de confirmer le phénotype céphalosporinase.

### **2.8.2 Technique**

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant de la cloxacilline à une concentration finale de 500 µg/ml et de 1000 µg/ml.

### 2.8.3 Lecture

Un résultat positif est noté lorsqu'une augmentation des diamètres d'inhibition d'au moins 8 mm autour des disques de ceftazidime et de céfotaxime est observée.

## 2.9 Test de synergie (Philippon et Arlet., 2006)

### 2.9.1 Principe

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

### 2.9.2 Technique

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablementensemencée par la souche à tester, un disque de ceftazidime et/ou céfotaxime et un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), distant de 1 cm et  $\frac{1}{2}$ .

### 2.9.3 Lecture

Un résultat positif est noté lorsqu'une image de synergie est observée entre les deux disques.

## 2.10 Test de Hodge (Lee et al., 2003)

### 2.10.1 Principe

Il consiste à mettre en évidence l'hydrolyse de l'imipénème par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide d'une bactérie indicatrice sensible (*Escherichia coli*).

### 2.10.2 Technique

- Préparer une suspension d'*Escherichia coli* 25922 de  $10^8$  UFC/ml
- Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mueller Hinton

- Faire une lourde strie de la souche à tester à partir d'un prélèvement de quelques colonies d'une culture sur milieu Mueller Hinton gélosé du centre de la boîte vers la périphérie
- Sécher les boîtes 15 minutes
- Déposer un disque d'imipénème au centre (à l'extrémité de la strie)
- Incuber 18 heures à 37° C.

### 2.10.3 Lecture

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* indicatrice (Figure 12).

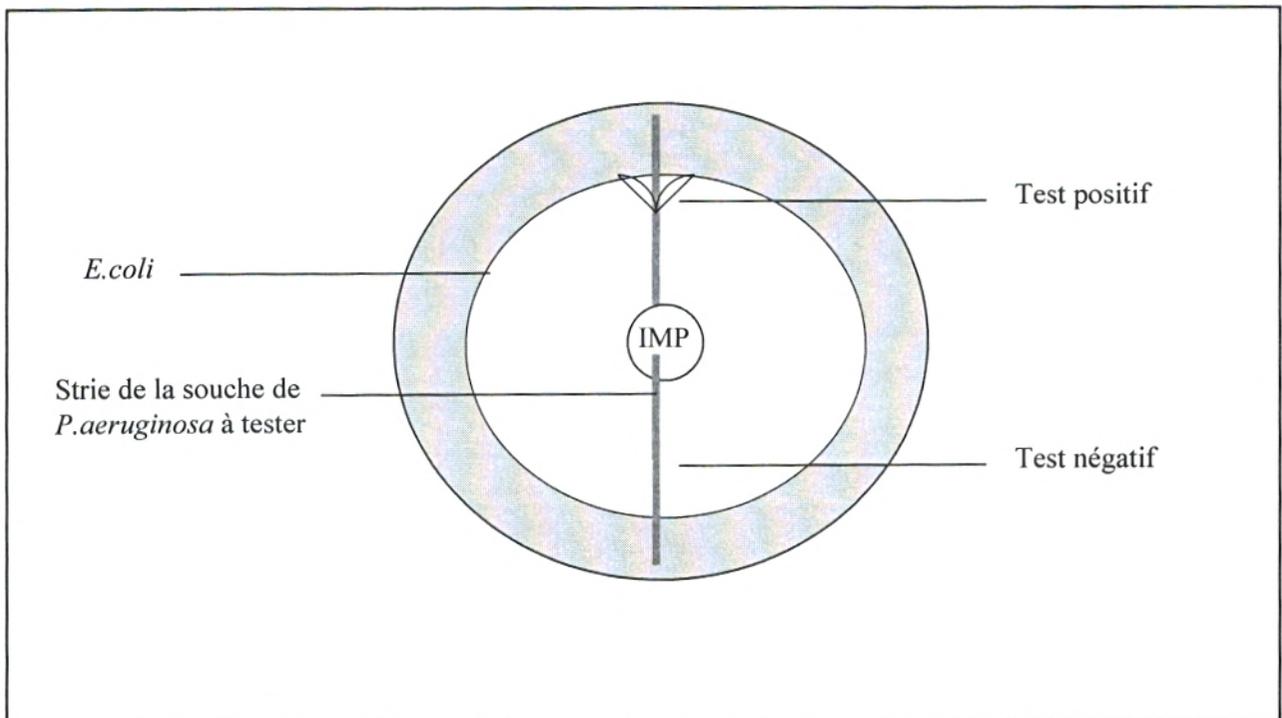


Figure 12. Lecture du test de Hodge (Lee et al., 2003)

## 2.11 Test à l'EDTA (Jesudason et al., 2005)

### 2.11.1 Principe

Il permet de différencier entre les métallob- $\beta$ -lactamases et les autres carbapénémases de classe A ou D.

### 2.11.2 Technique

Elle consiste soit à déposer 4 µl d'EDTA 0,5 M, pH 8, sur un disque d'imipénème soit 10 µl d'EDTA 0,5 M, pH 8, sur un disque blanc (papier filtre Wathmann n°2, diamètre 6 mm), placé 1 cm et ½ bord à bord avec un disque d'imipénème.

### 2.11.3 Lecture

Un résultat positif se traduit par un accroissement de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème supplémenté d'EDTA pour la première méthode et une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui de l'EDTA pour la deuxième.

## 2.12 Conjugaison (Tichat, 1995)

### 2.12.1 Principe

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

### 2.12.2 Technique

- Ensemencer la souche réceptrice et les souches donatrices en bouillon BHIB et incubé 18 à 24 heures à 37° C
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1/2
- Mélanger doucement
- Incuber 18 à 24 heures
- Réaliser des dilutions de 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-2</sup> du mélange
- Ensemencer par strie le mélange et chaque dilution sur un milieu de sélection
- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice sur la même boîte
- Incuber 24 heures à 37° C.

### 2.12.3 Lecture

Analyser les transconjugants en réalisant des antibiogrammes et/ou des CMI.

### 2.12.4 Préparation des boîtes de sélections

Incorporer à une gélose Mueller Hinton, de la ticarcilline et de la ciprofloxacine à des concentrations finales de 64 µg/ml et de 1 µg/ml respectivement.

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

### 2.13.1 Principe

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

### 2.13.2 Technique

- Réaliser une culture bactérienne dans 5 ml de LB et incuber 24 heures à 37° C
- Centrifuger 3 ml de culture à 14000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante
- Jeter le surnageant et sécher le culot
- Ajouter 100 µl de TE. Bien vortexer
- Ajouter 200 µl de solution de lyse
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Incuber à 55° C pendant 30 minutes. Agiter de temps à autre
- Ajouter 600 µl (2 volumes) de phénol-chloroforme-isoamylalcool (24 : 25 : 1)
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 15 mn
- Récupérer délicatement la phase supérieure dans un nouveau microtube.

## 2.14 Electrophorèse d'ADN plasmidique (Sambrook et Russel., 2001)

### 2.14.1 Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des particules chargées selon leur taille respective. Les acides nucléiques étant chargés négativement, sous l'application d'un champ électrique, ils vont migrer vers l'électrode positive (l'anode). Les petites molécules seront moins retenues dans le gel que les grosses molécules, ce qui leur permettra de migrer plus rapidement.

### 2.14.2 Technique

#### Préparation du gel d'agarose

- Pour un gel de 0,8%, dissoudre par chauffage jusqu'à ébullition, 1,6 g d'agarose (Sigma) dans 200 ml de tampon TBE 1X
- Refroidir la solution à 55° C dans un bain Marie, puis couler le gel dans un moule dont les 2 extrémités ont été préalablement fermées par du ruban adhésif
- Déposer un peigne dans le gel afin de réaliser les puits
- Laisser solidifier
- Retirer le peigne du gel et le ruban adhésif du moule
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse
- Ajouter un volume de tampon TBE 1X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1 mm au dessus).

#### Ensemencement

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

### **Migration**

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

### **Révélation**

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

## PARTIE III

# RESULTATS & DISCUSSION

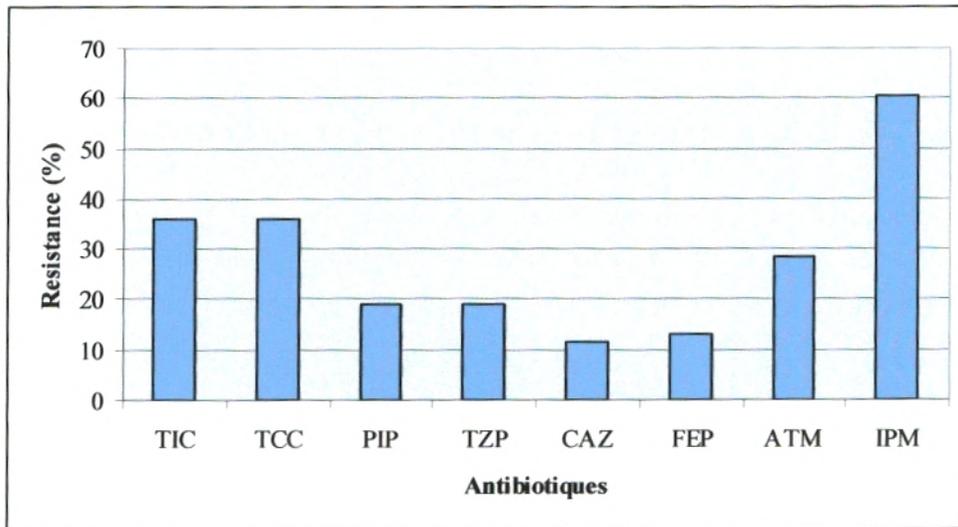
## 1. Résultats

### 1.1 Isolement et Identification

Pendant la période d'étude de 18 mois (Novembre 2005 - Avril 2007), 95 (38%) souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de 250 prélèvements: 129 au niveau du service de Neurochirurgie et 121 au niveau de celui de Traumatologie. L'identification par galerie API 20 NE a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques du genre *Pseudomonas* : réduction des nitrates en nitrites, attaque du glucose par voie oxydative, présence d'une arginine dihydrolase et utilisation du glucose comme seule source de carbone. L'assignation des souches à l'espèce *aeruginosa* a été réalisée grâce à la présence d'une gélatinase, à l'assimilation de l'acide adipique, une oxydase positive ainsi qu'à la possibilité de culture à une température de 42° C et à la production d'une odeur aromatique particulière.

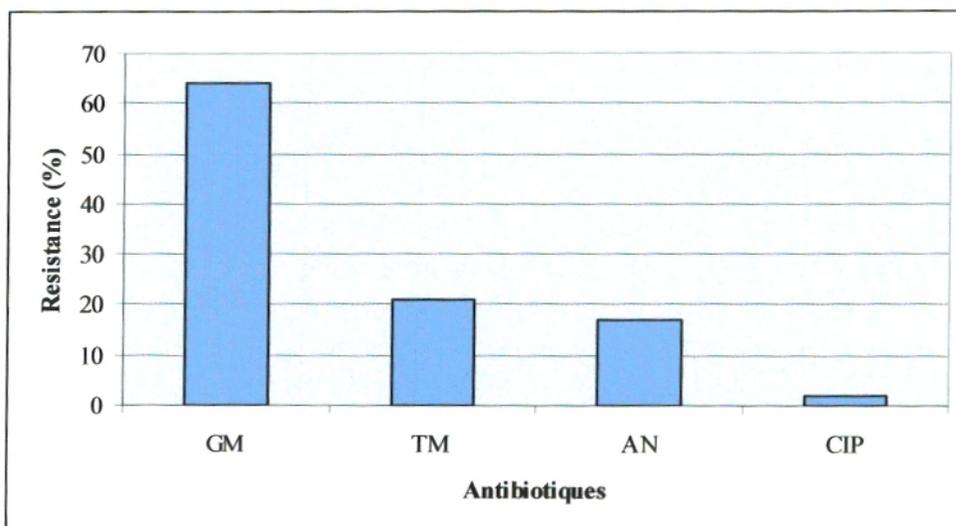
### 1.2 Sensibilité aux antibiotiques

Les taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines au niveau du service de Neurochirurgie étaient les suivants : ticarcilline et ticarcilline + acide clavulanique (35,9%), pipéracilline et pipéracilline + tazobactam (18,9%), ceftazidime (11,3%), céfépime (13,2%), aztréonam (28,3%), imipénème (60,4%) (Figure 13). Le taux élevé de résistance à l'imipénème est dû à une résistance intermédiaire dans 43,4% des cas. La résistance totale (CMI >8  $\mu\text{g/ml}$ ) a concerné seulement 17% des souches.



**Figure 13. Pourcentages de résistance (R+I) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines en Neurochirurgie**

Pour ce qui concerne les aminosides et la fluoroquinolone (Figure 14), le plus important taux a été observé pour la gentamicine (64,2%), suivi de celui de la tobramycine (20,8%), amikacine (17%) et ciprofloxacine (1,9%).



**Figure 14. Pourcentages de résistance (R+I) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides + fluoroquinolone en Neurochirurgie**

Au niveau du service de Traumatologie, les taux de résistance aux antibiotiques (Figure 15 et 16) étaient : ticarcilline (23,8%), ticarcilline + acide clavulanique (19%), piperacilline (4,8%), piperacilline + tazobactam (2,4%), ceftazidime (2,4%), céfépime (4,8%), aztréonam (21,4%), imipénème (35,7%), gentamicine (38%), tobramycine (9,5%), amikacine (4,8%). Aucune résistance n'a été observée pour la ciprofloxacine.

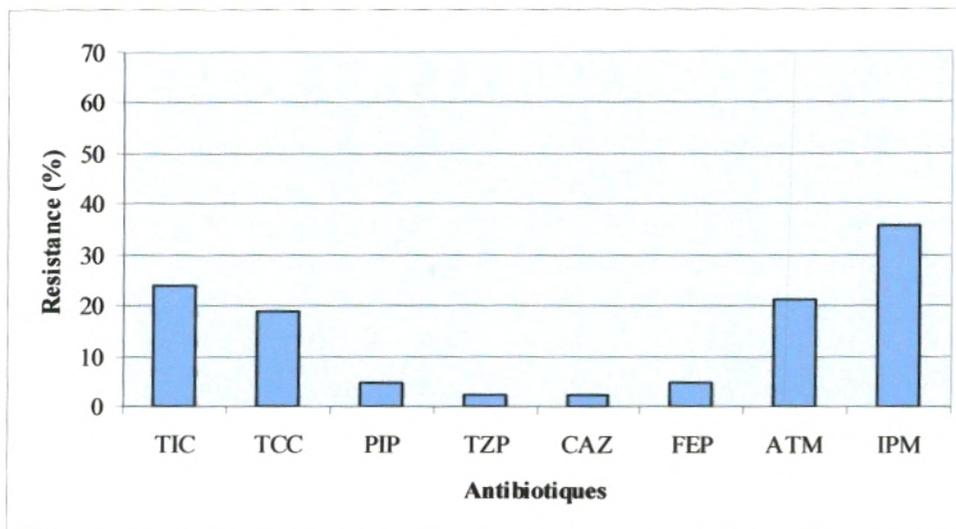


Figure 15. Pourcentages de résistance (R+I) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines en Traumatologie

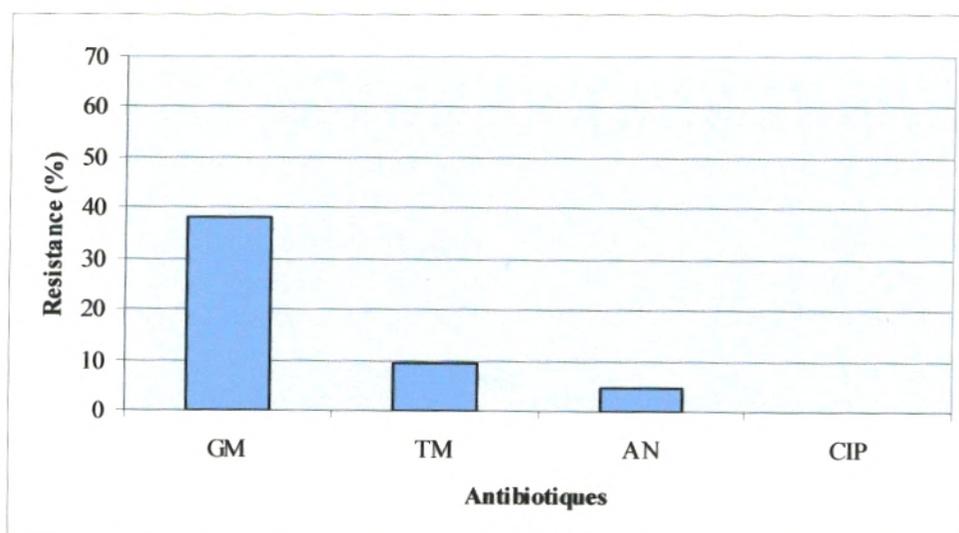


Figure 16. Pourcentages de résistance (R+I) des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides + fluoroquinolone en Traumatologie

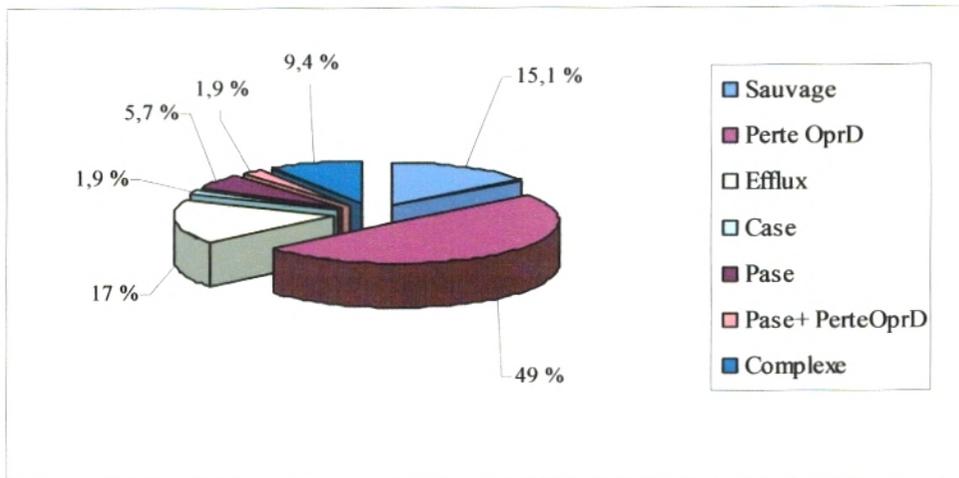
### 1.3 Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

L'utilisation d'antibiotiques comme marqueurs de détection phénotypique a permis de mettre en évidence les différents phénotypes de résistance rencontrés au niveau des deux services (Tableau 4, Annexe 8). Chaque phénotype de résistance étant défini comme l'expression donnée par le mécanisme de résistance à cette classe d'antibiotiques.

**Tableau 4. Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

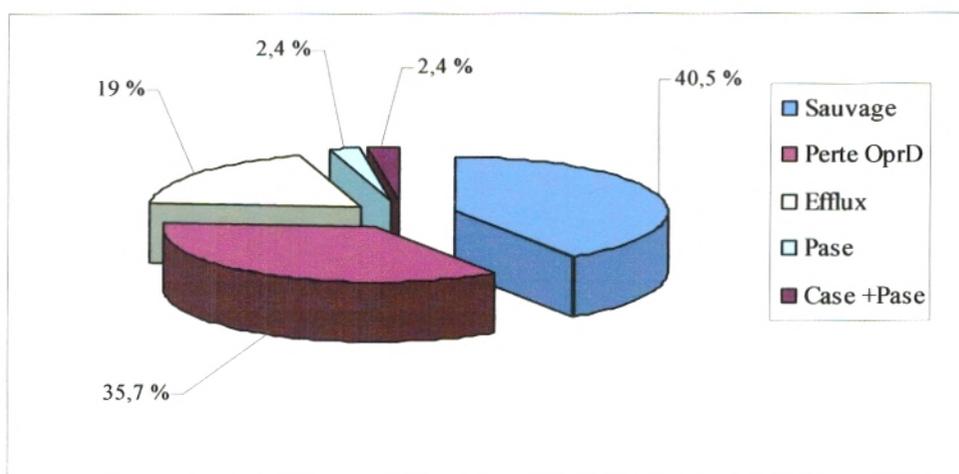
TIC	TZP	CAZ	FEP	IPM	Phénotypes observés
$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 8$	
8-16	2-4	0,5-2	0,5-4	1-4	Sauvage
8-16	2-4	0,5-2	0,5-4	8-16	Perte OprD
32-128	4-16	2-4	2-8	1-4	Efflux
64	32	32	16	1	Céphalosporinase (Case)
>512	128	64	32	4	Céphalosporinase +Pénicillinase
>512	16-32	1-2	2-4	2-4	Pénicillinase (Pase)
>512	32	2	2	16	Pénicillinase + Perte OprD
>512	64-256	16-64	16-32	32	Complexe

La répartition des phénotypes de résistance acquise au niveau du service de Neurochirurgie a révélé la prédominance des mécanismes non enzymatiques (66%) avec 49% de perte OprD et 17% d'efflux. Le phénotype enzymatique (18,9%) était représenté par l'hyperproduction de céphalosporinase (Case) chromosomique (1,9%), la production de pénicillinase (Pase) acquise isolée et/ou associée au mécanisme perte OprD (7,6%) et un phénotype complexe chez 9,4% des souches (Figure 17).



**Figure 17. Distribution des phénotypes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines en Neurochirurgie**

Au niveau du service de Traumatologie, la résistance à la ticarcilline (23,8%) a été attribuée à un phénotype non enzymatique dans 19% des cas, à la présence d'une  $\beta$ -lactamase acquise (2,4%) et à une association céphalosporinase + pénicillinase dans 2,4% des cas également. Parmi les souches sensibles à la ticarcilline (76,2%), 40,5% étaient représentées par le phénotype sauvage et le reste, 35,7% par le mécanisme perte OprD (Figure 18).



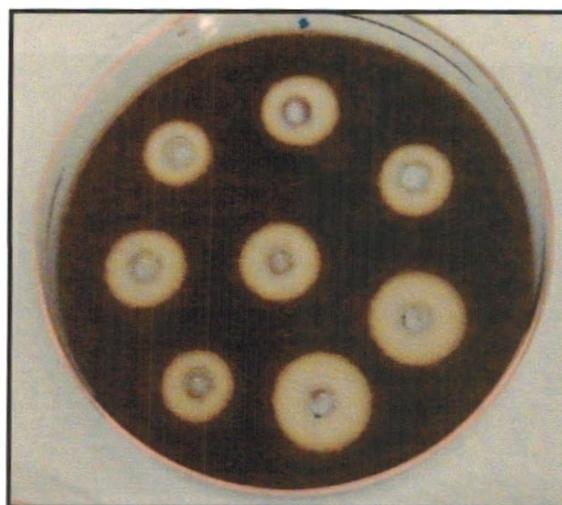
**Figure 18. Distribution des phénotypes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines en Traumatologie**

La caractérisation phénotypique du mécanisme d'efflux a été réalisée par le test au phényl-argénine- $\beta$ -naphtylamide (PA $\beta$ N). L'augmentation des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés en présence d'une concentration définie de cet inhibiteur a permis de confirmer ce phénotype (Figure 19).



**Figure 19. Résultat du Test au PA $\beta$ N**

La mise en évidence de la présence d'enzyme a été réalisée grâce au test iodométrique qui s'est révélé positif pour les souches présentant un phénotype céphalosporinase et/ou pénicillinase, éventuellement associé (Figure 20).



**Figure 20. Résultat du Test iodométrique**

Pour ce qui concerne la P27, l'inhibition de la céphalosporinase a permis de mettre en évidence la présence d'une pénicillinase associée (Figure 22).



Figure 22. Mise en évidence du phénotype pénicillinase + céphalosporinase

Le caractère inductible de la céphalosporinase partiellement dérèprimée exprimée par la P110 a été démontré par une image d'antagonisme entre l'imipénème et les céphalosporines à large spectre ainsi que par une diminution de l'activité de la ticarcilline par l'acide clavulanique.

Tableau 6. Résultats de CMI (µg/ml) pour les souches de phénotype céphalosporinase

	TIC ≤16 >64	TCC ≤16 >64	PIP ≤16 >64	TAZ ≤16 >64	CTX ≤4 >32	CAZ ≤4 >32	FEP ≤4 >32	ATM ≤4 >32	IPM ≤4 >8	Mécanisme suspecté
<b>P27</b>	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	Case derepression totale +Pase
<b>P110</b>	64	256	32	32	512	32	16	32	1	Case derepression partielle

Cinq (9,4%) souches de phénotype complexe ont été observées au niveau du service de Neurochirurgie. Elles ont présenté une résistance aux carboxypénicillines, uréidopénicillines, céphalosporines de troisième et quatrième génération, monobactame et carbapénème (Tableau 7).

Tableau 7. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype complexe

	TIC	TCC	PIP	TAZ	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	Mécanisme suspecté
	$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 8$							
<b>P238</b>	>512	256	512	128	512	16	32	16	32	Case +Pase + OprD
<b>P239</b>	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	Case +Pase + OprD
<b>P240</b>	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case +Pase + OprD
<b>P241</b>	>512	256	>512	128	>512	16	16	16	32	Case +Pase + OprD
<b>P242</b>	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	Case +Pase + OprD

La caractérisation phénotypique de ces souches a été réalisée par les tests à la cloxacilline, synergie, Hodge et EDTA. Aucune BLSE ou carbapénémase n'a été détectée. La récupération de l'activité des C3G par la cloxacilline a permis de mettre en évidence la présence d'une AmpC associée à une pénicillinase. La résistance à l'imipénème (CMI = 32) a été attribuée au mécanisme perte OprD.

#### 1.4 Résistances associées

Pour ce qui concerne les aminosides, les isolats résistants au niveau des deux services étaient plus fréquents parmi les souches productrices de  $\beta$ -lactamases acquises. La résistance à la gentamicine pour les mécanismes non enzymatiques a concerné surtout les souches qui ont présenté le phénotype OprD (85,4%), contrairement à celles qui surexprimaient les systèmes d'efflux où aucune résistance n'a été observée. (Tableau 8). La seule souche présentant une résistance à la ciprofloxacine était de phénotype OprD.

Tableau 8. Résistances associées

Phénotype	Nombre total de souches isolées	Nombre de souches résistantes			
		GM	TM	AN	CIP
Sauvage	25	3	0	0	0
OprD	41	35	3	0	1
Efflux	17	0	0	0	0
Case	1	0	0	0	0
Pase	4	4	4	4	0
Case +Pase	1	1	1	1	0
Pase + OprD	1	1	1	1	0
Case + Pase + OprD	5	5	5	5	0

### 1.5 Transfert d'antibiorésistance

Les conjugaisons ont été réalisées entre une souche de référence : PU21 résistante à la ciprofloxacine (PU21 CIP R) (Figure 23) et les souches présentant un phénotype pénicillinase isolé ou associé à un autre mécanisme et une résistance aux aminosides (Figure 24)

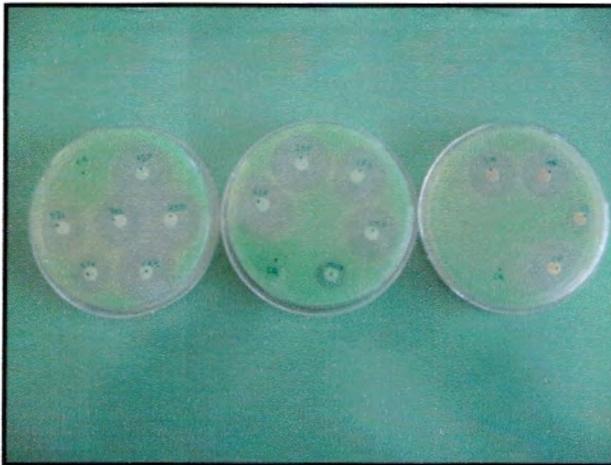


Figure 23. PU21 CIP R

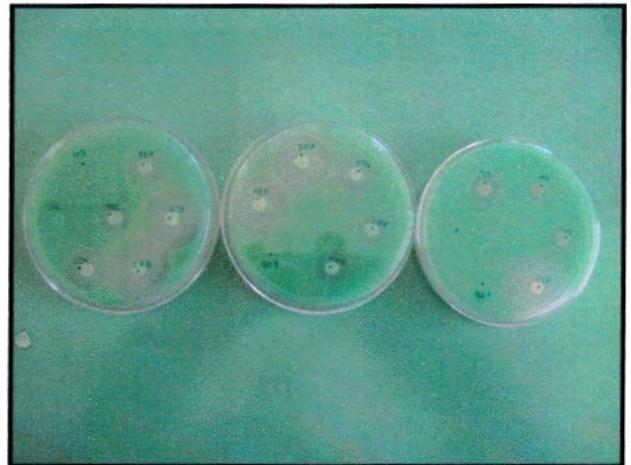


Figure 24. Pénicillinase P108

L'analyse des profils de résistance des transconjugants par la méthode de diffusion (Figure 25) et de dilution (Annexe 11) en milieu solide a permis de mettre en évidence la nature transférable du déterminant génétique codant pour la résistance aux carboxypénicillines, uréidopénicillines et aminosides.



Figure 25. Transconjugant 108

## 2. Discussion

Dans notre étude, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées avec une incidence de 41 et 34,7% au niveau des services de Neurochirurgie et de Traumatologie respectivement. Cependant, l'isolement de ces souches n'est pas une preuve de leur implication dans le processus infectieux en cours, car *Pseudomonas aeruginosa* n'est souvent qu'un simple colonisateur (Mesaros et al., 2007). Ce germe étant répandu dans l'environnement hospitalier, son manuportage par les patients et le personnel soignant favorise sa dissémination (Carmeli et al., 1999). Il présente une remarquable capacité de colonisation des patients immunodéprimés particulièrement dans les services de soins intensifs (Bertrand et al., 2003). Différents facteurs de risque associés à l'acquisition de cette bactérie ont été identifiés, dont la durée du séjour et l'antibiothérapie (Blanc et al., 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* est un germe dont les résistances acquises sont fréquentes. Il s'agit de résistances parfois associées entre elles, transitoires et adaptatives, c'est-à-dire favorisées par la pression de sélection de l'antibiothérapie (Aubron et al., 2002). Les taux de résistance aux antibiotiques étudiés, plus importants en Neurochirurgie qu'en Traumatologie rapportés par cette étude sont certainement liés aux différentes pressions de sélection exercées conséquences des types de pathologie traités.

Comparée aux données d'antibiosurveillance de l'Institut Pasteur d'Algérie, rapportées par Rahal en 2004 (Rahal et al., 2004), la résistance des souches étudiées aux différents antibiotiques est supérieure dans notre étude pour la ticarcilline, l'imipénème et la gentamicine avec des écarts de +12,6, +43,8 et +31,8% respectivement. La fréquence globale de résistance aux  $\beta$ -lactamines, exprimée par la résistance à la ticarcilline, atteint 30,5%, soit 7,5% de moins que dans une étude multicentrique menée en France par Cavallo en 2004 (Cavallo et al., 2007), cependant, la résistance à l'imipénème reste plus importante dans notre étude avec une différence de 32,5%. Les taux de résistance à la pipéracilline et à la ceftazidime concordent avec ceux de l'étude de Rahal, mais inférieurs à ceux de Cavallo en 2004 (9,4 et 14,6%). Pour ce qui concerne le taux de résistance à la ciprofloxacine, il est en dessous des données algériennes et françaises avec des écarts de -2,6% et -31% respectivement.

Si ces différences ne peuvent être comparées statistiquement du fait de la variabilité entre les types d'hôpitaux et les services inclus dans ces enquêtes, les écarts sont cependant importants et sont vraisemblablement en relation avec la pression de sélection exercée par l'utilisation de ces antibiotiques. La surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques permet d'adapter l'antibiothérapie probabiliste, car les infections à *Pseudomonas aeruginosa* du fait de leur gravité, mettent en jeu le pronostic vital et vont nécessiter une antibiothérapie rapidement débutée de plus bactéricide (Hamze et al., 2004).

La détection des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* en routine, est particulièrement importante (Bert et al., 2003) car elle permet la suppression des fausses sensibilités aux antibiotiques qui en réalité, sous l'influence des mécanismes de résistance impliqués et interférant ne peuvent être valablement retenus pour actifs dans le cadre d'une antibiothérapie (Monteil, 2003).

La grande majorité des bactéries classées dans le groupe « résistance non enzymatique », qui rassemble les souches ne produisant pas de  $\beta$ -lactamases acquises et dont les taux de céphalosporinase sans induction est voisin de celui des souches sensibles, est représentée par une résistance isolée à l'imipénème (43,2%). Ce phénotype caractéristique de la modification de la porine D<sub>2</sub> spécifique de la perméabilité de *Pseudomonas aeruginosa* à cet antibiotique (Philippon, 1998) a aussi été retrouvé parmi les souches présentant un phénotype pénicillinase et/ou associé à une céphalosporinase. L'hyperproduction de l'AmpC associée à la fermeture de la porine D<sub>2</sub> conduit à une augmentation des CMI de l'imipénème plus importante que la fermeture isolée de la porine D<sub>2</sub> (Cavallo et al., 2001). La prédominance de ce mécanisme de résistance au niveau des deux services est certainement liée à l'utilisation massive de l'imipénème. En effet, la prévalence des phénotypes de résistance observés au sein d'un service constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription (Bertrand et al., 2003).

La résistance à la ticarcilline par un mécanisme non enzymatique (17,9%), est probablement due à l'association d'une perméabilité diminuée et d'une hyperexpression de l'efflux, essentiellement système d'efflux MexAB-OprM,

constitutif chez cette bactérie (Masuda et al., 2000). Le phénotype des souches surexprimant ce système d'efflux est caractéristique : la ticarcilline et l'aztréonam sont presque toujours classés intermédiaires, tandis que les uréidopénicillines moins touchés, restent le plus souvent classés sensibles ainsi que la ceftazidime. L'imipénème n'est pas affecté par ce mécanisme de résistance (Péchère et Kohler., 1999 ; Plésiat et al., 1998). L'inhibition de l'efflux MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa* par le phényl-arginine- $\beta$ -naphtylamide (PA $\beta$ N) augmente l'activité des différentes  $\beta$ -lactamines (Lomovskaya et al., 2001). Cependant, cette récupération d'activité ne peut être observée que chez les souches qui n'expriment pas un haut niveau de  $\beta$ -lactamases (Masuda et al., 1999).

La résistance aux céphalosporines de troisième et quatrième génération chez *Pseudomonas aeruginosa* est associée dans la plupart des cas à l'hyperproduction de la céphalosporinase naturelle (Nordmann et Guibert., 1998). La dérégulation de cette  $\beta$ -lactamase AmpC affecte 7,4% des souches isolées, dont 6,3% présentent un phénotype pénicillinase associé. Le céfépime et l'aztréonam résistent mieux que la ceftazidime à l'hyperproduction de la céphalosporinase alors que la ceftazidime reste la plus active sur les souches exprimant un mécanisme non enzymatique ou une pénicillinase. L'expression phénotypique de ces différentes  $\beta$ -lactamases est dans la majorité des cas une base de départ rapide de leur identification future. Cependant, la combinaison de plusieurs mécanismes de résistance rend plus complexe l'individualisation pratique d'un phénotype (Philippon et Arlet., 2006).

La fréquence des résistances associées aux aminosides parmi les souches productrices de  $\beta$ -lactamases acquises et parmi les souches hyperproductrices de céphalosporinases AmpC peut résulter soit de l'accumulation de mécanismes de résistance indépendants, soit de la diffusion de matériel génétique (plasmides, transposons) codant plusieurs caractères de résistance ( $\beta$ -lactamines, aminosides ....) (Cavallo et al., 2001).

L'acquisition de la résistance aux carboxypénicillines, uréidopénicillines et aminosides par la souche PU21 CIP R après conjugaison, conforte l'hypothèse de dissémination de matériel génétique codant pour le phénotype pénicillinase et résistance aux aminosides. L'absence de plasmides au niveau des souches donatrices

(à l'exception de la P108) et de leur transconjugant laisse suggérer que cette résistance est portée par des transposons. Ces éléments génétiques présents sous forme intégrée au chromosome sont capables de s'exciser pour former une molécule circulaire non-répliquative qui peut alors être transférée par conjugaison à la cellule hôte (Schwarz et al., 1991). Le transposon ainsi transféré est ensuite inséré dans le chromosome de la cellule hôte (Doublet, 2004).

# CONCLUSION

La diversité des mécanismes de résistance mis en œuvre par *Pseudomonas aeruginosa* est un réel sujet de préoccupation.

L'étude de l'antibiorésistance de cette bactérie au niveau des services de Neurochirurgie et de Traumatologie du C.H.U de Tlemcen a permis d'apprécier l'efficacité des antibiotiques utilisés. La prédominance du phénotype perte OprD a été attribuée à l'utilisation importante de l'imipénème. L'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique et la production d'une pénicillinase acquise associées ou non, étaient les mécanismes de résistance aux bêtalactamines qui posaient le plus de problèmes thérapeutiques. Ces résistances enzymatiques étaient le plus souvent de haut niveau et des résistances croisées aux aminosides étaient par ailleurs fréquemment associées.

L'absence de nouveaux mécanismes de résistance (bêtalactamases à spectre élargi, carbapénémases) au niveau des souches étudiées incitent à une vigilance particulière pour dépister l'apparition de tels phénotypes.

Les taux de résistance atteints vis-à-vis de certaines molécules et l'émergence des souches multirésistantes doivent amener les cliniciens à une utilisation judicieuse des antibiotiques sur la base de méthodes simples de détection des mécanismes de résistance et au renforcement des mesures d'hygiène susceptibles d'éviter leur dissémination.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## A/

- ✕ ➤ **Ambler R.P. (1980)**. The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci. 289: 321-331.
- ✕ ➤ **Arlet G, Philippon A. (1997)**. Les bêta-lactamases: une évolution sous la contrainte. Médecine thérapeutique. Vol 3, hors série. P: 66-76.
- ✕ ➤ **Arlet G, Philippon A. (2003)**. Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Revue Française des Laboratoires. 352: 41-55.
- **Aubert G, Carricajo A. (2005)**. De l'antibiogramme a la prescription des antibiotiques. Laboratoire de Bactériologie. CHU-Hôpital de Bellevue. DESC. Réanimation médicale. <http://reamed.ujf-grenoble.fr/seminaires/archives/2005>
- **Aubron C, Rapp C, Parienti J.J, Patey O. (2002)**. Actualité de l'antibiothérapie inhalée dans les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*. Méd Mal Infect. 32: 460-467.
- **Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000)**. Bactériologie clinique. Ed Ellipses.

## B/

- ✕ ➤ **Barrial K, Scotet J. (2006)**. Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspectives d'évolution. DES Bactériologie.
- **Bedos J.P. (2003)**. Stratégies thérapeutiques dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation. 22: 534-538.
- **Bergogne-Bérézin E, Dellamoniaca P. (1999)**. Antibiothérapie en pratique clinique. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson.
- **Bert F. (2002)**. Biologie de *Pseudomonas aeruginosa* : épidémiologie, résistance aux antibiotiques. Chapitre 1. P: 6-15
- **Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V, Quentin G, Lambert N, Arlet G. (2003)**. Evaluation of the Osiris Expert System for Identification of  $\beta$ -lactam Phenotypes in Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. P3712-3718.

- **Bertrand X, Blasco G, Belle E, Boillot A, Capellier G, Talon D. (2003).** Importance de la transmission croisée dans l'épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* en soins intensifs. Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation. 22: 505-509.
- **Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. (1998).** Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. Clin Microbiol Infect. 4: 242-7.
- **Boffi El Amari E. (2004).** Traitement et pronostic des bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat.
- **Bradford P.A. (2001).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951.
- **Bryskier A. (1999).** Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses.
- ✕ ➤ **Bush K, Jacoby G, Medeiros A. (1995).** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233.
- C/
- **Carmlı Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. (1999).** Emergence of antibiotic – resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparaison of risks with different antipseudomonals agents. Antimicrob. Agents. Chemother. 43 (6): 1379-82.
- **CA SFM. (2006).** Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>.
- **Catherine P-B. (2003).** Développement accéléré de nouveaux inhibiteurs contre les protéines de division cellulaire FtsZ et FtsA de *Pseudomonas aeruginosa*. Maîtrise de Microbiologie - Immunologie.
- ✕ ➤ **Cattoir V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Path Biol. 52: 607-616.
- ✕ ➤ **Cavallo J.D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004).** Bétalactamines. EMC-Maladies Infectieuses. 1 : 129-202.

- **Cavallo JD, Hocquet D, Plésiat P, Fabre, Roussel-Delvallez M. (2007).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J.Antimicrob. Chemother.* 59 (5): 1021-1024.
- **Cavallo J.D, Leblanc F, Fabre R, Fourticq-Esqueoute A, GERPB. (2001).** Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux bêtalactamines : étude GERPB 1999. *Pathol Biol.* 49: 534-9.
- **Cavallo J.D, Plésiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. (2002).** Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM- overproducing strains in a French multicentere study (1997). *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 1039-1043.
- ✕ ➤ **Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J, Fonzé E, Fraipont C, Frère J.M, Galleni M, Goffin C, Joris B, Lamotte-Brasseur J, Nguyen-Distèche M. (1998).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *medecine /science.* 14: 544-55.
- **Courvalin P, Drugeon N, Flandrois J.P, Goldstein F. (1991).** Aspects théoriques et thérapeutiques. *Bactéricidie.* Ed Maloine.
- **Courvalin P, Goldstein J, Philippon A, Sirot J. (1985).** Antibiogramme. MPC Ed. P225-235.
- **Crespo M.P, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann E, Turton J, Glover J, Velez J.D, Castaneda C.R, Recalde M, Livemore M. (2004).** Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a novel Metallo- $\beta$ -lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J.Clin.Microbiol.* 42 (11): 5091-5101.
- D/**
- **De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. (2002).** Prospective survey of  $\beta$ -lactamases produced by Ceftazidime Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46 (9): 3031-3034.
- **de Kievit T, Iglewski BH. (2000).** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity.* 68:4839–49.

➤ **Doublet B. (2004).** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol *florR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat.

**E/**

➤ **Ehlers L.J, Bouwer E.J. (1999).** RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Wat. Sci. Tech.* 39 (7): 163-171.

**F/**

➤ **Foca M.D. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. *Seminars in Perinatology.* 26 (5): 332-339.

**G/**

✕ ➤ **Gaudy C, Buxeraud J. (2005).** Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. Ed Elsevier.

➤ **Gautier V. (2007).** Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

➤ **Girlich D, Naas T, Nordmann P. (2004).** Biochemical Characterization of the Naturally Occuring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48 (6): 2043-2048.

**H/**

➤ **Hamze M, Dabboussi F, Izard D. (2004).** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998-2001) au nord du Liban. *Méd Mal Infect.* 34: 321-324.

➤ **Hancock R.E.W, Speert D. (2000).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates.* 3: 247-255.

➤ **Hocquet D, Lianes C, Party I, El Garch F, Plésiat P. (2004).** Deux systèmes d'efflux exprimés simultanément chez des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*. Path biol. 52: 455-461.

## J/

➤ **Jesudeason M.V, Kandathil A.J, Belaji V. (2005).** Comparaison of two methods to detect carbapenemase and metallo-  $\beta$ -lactamases production in clinical isolates. Indian J Med Res. 121. P780-783.

## K/

➤ **Kado C.I, Liu S.T. (1981).** Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J.Bacteriology. 145 (3): 1365-1373.

➤ **Kazmierczack A. (1999).** Inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. P: 446- 457.

➤ **Kong K.F, Jayawardena S.R, Puerto A.D, Wiehlmann L, Laabs U, Tummler B, Mathee K. (2005).** Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. Gene. 358: 82-92.

## L/

✕ ➤ **Labia R. (1999).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. P: 436 -445.

➤ **Langaee T.Y, Gagnon L, Huletsky A. (2000).** Inactivation of the *ampD* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Leads to Moderate-Basal-Level and Hyperinductible AmpC  $\beta$ -lactamase Expression. Antimicrob. Agents. Chemother. 44 (3): 583-589.

➤ **Larabi K, Masmoudi A, Fendri C. (2003).** Etude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis : à propos de 1930 cas. Med. Mal. Infct. 33: 348-352.

➤ **Lee K, Lim Y.S, Yong D, Yum J.H, Chong Y. (2003).** Evaluation of the Hodge Test and the Impenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-

$\beta$ -lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 41 (10): 4623-4629.

➤ **Le Noc P. (1999)**. Monolactames in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. P: 374- 391.

➤ **Liasine N. (2000)**. Problèmes des pathogènes Gram négatifs résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. Schweiz Med Wochenschr. 130 : 1930-6.

➤ **Livermore DM. (1995)**. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 8: 557-584.

➤ **Livermore D.M. (2002)**. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? Antimicrobial Resistance. 34: 634-640.

➤ **Livermore DM. (2001)**. Of *Pseudomonas aeruginosa*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother. 47: 247-250.

➤ **Livermore DM, Brown DF. (2001)**. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. J. Antimicrob. Chemother. 48, suppl. S1.59-64.

➤ **Livermore D.M, Woodford N. (2000)**. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr. Opin. Microbiol. 3: 489-495.

➤ **Lomovskaya O, Warren M.S, Lee A, Gallazo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee V.J. (2001)**. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrob. Agents. Chemother. P105-116.

## M/

➤ **Marchal N, Bourdon J.L, Richard C.L. (1987)**. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries. 3<sup>ème</sup> Ed Doin.

➤ **Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. (1999)**. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactam in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 400-402.

- **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. (2000).** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 3322-7.
- **Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Eldere V, Glupczynsky Y, Laethem V, Jacobs F, Lebeque P, Malfroot A, Tulkens P.M, Van Bambeke F. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques.* 1-31.
- **Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynsky Y, Vanhoof R, Tulkens P.M. (2005).** L'efflux des antibiotiques: un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Medical Louvain.* 124 (8) : 308-320.
- **Mimoz O. (2003).** Impact des résistances bactériennes. *Conférences d'actualisation.* P: 665-672.
- **Monteil H. (2003).** En quoi le microbiologiste peut-il contribuer à l'amélioration de la qualité de l'antibiothérapie ? *Med mal infect.* 33: 1s-12s.
- ✘ ➤ **Mouton Y, Bingen E, Deboscker Y, Dubreuil L. (2000).** *Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux.* Ed John Libbey Eurotext.
- **Murphy T.A, Simm A.M, Tolemann M.A, Jones R.N, Walsh T.R (2003).** Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 582-587.
- N/
- **Nauciel C, Vildé J.L. (2005).** *Bactériologie médicale.* Ed Masson.
- **Nordmann P. (2003).** Mécanismes de résistance aux bêtalactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation.* 22: 527-530.
- **Nordmann P, Guibert M. (1998).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 128-131.
- **Nordmann P, Poirel L. (2002).** Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8 :321-331.

## O/

➤ **Ochs M.M, McCusker M.P, Bains M, Hancock R.E.W. (1999).** Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43 (5): 1085-1090.

## P/

➤ **Paterson DL, Bonomo RA. (2005).** Extended spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-86.

➤ **Péchère JC, Kohler T. (1999).** Patterns and modes of betalactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 5: 15-8.

➤ **Philippon A. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* : phénotypes de résistance aux antibiotiques. *Méd Mal Infect.* 28: 134-49.

✕ ➤ **Philippon A, Arlet G. (2006).**  $\beta$ -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel! *Ann Biol Clin.* 64 (1) : 37-51.

➤ **Plésiat P, Ramos-Aires J, Péchère JC, Kohler T. (1998).** Systèmes d'efflux actifs chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Méd Mal Infect.* 28: 126-33.

➤ **Poirel L. (2006).** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : Quelles perspectives ? XVIIe Congrès national de la SFHH – Nantes.

➤ **Poirel L, Rotimi V.O, Mokaddas E.M, Karim A, Nordmann P. (2001).** VEB-1-Like Extended –Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerging Infectious Diseases.* Vol 7. (3) : 468-470.

➤ **Prince AS. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa*, in Long SS, Pickering LK, Prober CG (eds): *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (ed 2). New York, NY, Churchill Livingstone, in press.

## R/

✕ ➤ **Rahal K. (2004).** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 6<sup>ème</sup> rapport d'évaluation. Institut Pasteur d'Algérie.

- **Richard K. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA 3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Maîtrise en Microbiologie - Immunologie.
- **Rio Y, Pina P, Jurin F, Allouch P, Didion J, Chardon H, Chiche D. (2002).** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques, isolés chez des maladies de soins intensifs français en 1998. Phénotype de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Etude ESCRIME. Pathol Biol. 50 :12-7.
- **Rodriguez -Villalobos H, Struellens M.J. (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Réanimation. 15 : 205-213.
- **Ruimy R. (2003).** Etat actuel de la résistance bactérienne et principaux mécanismes en cause. Bacille à Gram négatif. Laboratoire de Bactériologie. Groupe Hospitalier Bichat-Claude-Bernard (GHBCB). [www.xbichat.jussieu.fr](http://www.xbichat.jussieu.fr).

S/

- **Salyers A.A, Whitt D.D. (2002).** Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2<sup>nd</sup> edn. Washington, D.C.: ASM Press. Chapter 16: p 247-262.
- **Sambrook J, Russel D.W. (2001).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Ed CSHL PRESS. Vol 1.
- **Schwarz S, Spies U, Cardoso M. (1991).** Cloning and sequence analysis of a plasmid - encoded chloramphenicol acetyl transferase from *Staphylococcus intermedius*. J. Gent. Microbiol. 137: 977-981.
- **Schweizer HP. (2003).** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res. 2: 48-62.
- **Sécher I, Hermès I, Pré S, Carreau F, Bahuet F. (2005).** Cas groupes d'infections du site opératoire à *Pseudomonas aeruginosa* en orthopédie/traumatologie. Méd Mal Infect. 35: 149-154.
- **Shahid M, Malik A, Agrawal M, Singhal S. (2004).** Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparaison with the conventional three-dimensional extract test. J. Antimicrob. Chemother. 54: 684-687.

➤ **Sinave C. (2003)**. Imipénème ou méropénème, quel est le meilleur choix pour les infections à *Pseudomonas aeruginosa* ? Méd Mal Infect. 33: 579-583.

✕ ➤ **Singleton P. (1999)**. Bactériologie. Ed Dunod.

#### T/

✕ ➤ **Tankovic J. (2000)**. Mécanismes d'action des antibiotiques. Précis de bactériologie clinique. Edition Eska. P: 584-595.

✕ ➤ **Tankovic J, Duval J. (1997)**. Mécanismes d'action des antibiotiques. Médecine thérapeutique. Vol 3, hors série. P: 37-45.

➤ **Tichat K.A. (1995)**. Caractérisation des  $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries. Thèse de magister.

➤ **Therrien C. (1998)**. Etude structure – Fonction de la  $\beta$ -lactamase PSE-4 : inhibition enzymatique et spécificité du substrat. Thèse de Doctorat.

➤ **Thomson J.M, Bonomo R.A. (2005)**. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria:  $\beta$ -lactams in peril. Current Opinion in Microbiology. 8: 518-524.

#### V/

➤ **Vedel G. (2005)**. Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. J. Antimicrob. Chemother. 56: 657-664.

➤ **Verdet C. (2007)**. Organisation génétique des céphalosporinases acquises. Thèse de Doctorat.

#### W/

➤ **Weber M. (2003)**. Les pièges de l'antibiogramme. Revue Française des laboratoires. 352: 21-26.

➤ **Weldagen GF, Poirel L, Nordmann P. (2003)**. Ambler class A extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 2385-92.

**Z/**

➤ **Zhanel G.G, Hoban D, Schurek K, Karlowsky J.A. (2004).** Role of efflux mechanisms on fluoroquinolones resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents*. 24: 529-535.

# ANNEXES

## Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de la Galerie API 20NE

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

Annexe 2. Tableau d'identification du catalogue analytique API 20NE

API 20 NE	V6.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		0	0	80	1	1	1	1	99	97	89	85	1	99	99	10	99	99	18	99		
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100	
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	5	2	1	97	99	1	100	99		99		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	0	75	87	87	1	99	85	1	100	
<i>Burkholderia cepacia</i>		0	24	1	1					100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99		0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	0	98	12		1	1	3	10		1	1	1				
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99		89	99		83	100
<i>Comamonas testosteroni/Ps. alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2				87		3	98
<i>Chryseomonas luteola</i>		78	0	13		1	100		98	99	99	88	12	76	85			1	94	94	1	2
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99	
<i>Ralstonia pickettii</i>		0	1	1	3	0	1	0	96		1	10	14	0	99	86		99	98	16	99	
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1		95	0	6	11	0	0	95	10	1		1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15		95		8	3				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		1	0	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0		1	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95				
<i>Acinetobacter wolffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	20			1			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99		1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2		0				2	21	2	0	0	2	0	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0				100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0		99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alicycigenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Alicycigenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alicycigenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99		91	100			100
<i>Alicycigenes xylooxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	90	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0		0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0		10	97	0	100	75	0	100		0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0		98	99	22		12		1	0		1	0	1	12	12	99	
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76			0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lecaneta</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp *</i>		0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	90	20	75	76		4	99				99
<i>Oligella ureolytica</i>		0	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95		96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		0	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100			0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	0	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0		91	10	76	1	18	75			76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0		78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio holisae</i>		100	100		0	0	0	0	3	10			0	24	1		0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0			0	0	7	100		100	0		99	99	99	99	17	0	99		0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99		98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6		0	0	95	91	0	100

**Annexe 3. Valeurs critiques des antibiotiques utilisés pour  
*Pseudomonas aeruginosa* (CA SFM, 2006)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque µg	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)		
			S	R	S	R	
<b>Béta-lactamines</b>	Ticarcilline	TIC	75	≤16	>64	≥22	<18
	Ticarcilline + acide clavulanique	TCC	75/10	≤16/2	>64/2	≥22	<18
	Pipéracilline	PIP	75	≤16	>64	≥18	<12
	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	75/10	≤16/4	>64/4	≥19	<14
	Cloxacilline	OX	5	2	2	20	20
	Imipénème	IPM	10	≤4	>8	≥22	<17
	Aztréonam	ATM	30	≤4	>32	≥23	<17
	Céfotaxime	CTX	30	≤4	>32	≥21	<15
	Ceftazidime	CAZ	30	≤4	>32	≥21	<15
	Céfopérazone	CFP	30	≤4	>32	≥21	<14
	Cefsulodine	CFS	30	≤8	>32	≥22	<14
	Céfépime	FEP	30	≤4	>32	≥21	<15
	Cefpirome	CPO	30	≤4	>32	≥21	<15
Moxalactam	MOX	30	≤4	>32	≥23	<17	
<b>Aminosides</b>	Tobramycine	TM	10	≤4	>8	≥16	<14
	Amikacine	AN	30	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamicine	GM	15	≤4	>8	≥16	<14
<b>Fluoroquinolone</b>	Ciprofloxacine	CIP	5	≤1	>2	≥22	<19

#### Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin et al., 1991)

Solution initiale ( $\mu\text{g/ml}$ )	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration obtenue ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration finale dans le milieu ( $\mu\text{g/ml}$ )
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	2,3	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

**Annexe 5. Solution et tampon pour le test iodométrique (Courvalin et al., 1985)**

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>	
<b>Solution iodo-iodurée</b>	Iode	1 g
	Iodure de sodium <i>Potassium</i>	27 g
	Eau	50 ml
<b>Tampon phosphate 0.5 M pH 7</b>	Solution A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 68,08 g/l)	39 ml
	Solution B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ 89,70 g/l)	61 ml

**raction de l'ADN plasmidique  
81)**

		<b>Composition</b>	
			3%
<b>Tampon TE</b>	Tris (Sigma)	50 mM	pH 12,6
	Tris	50 mM	
	EDTA (Sigma)	10 mM	

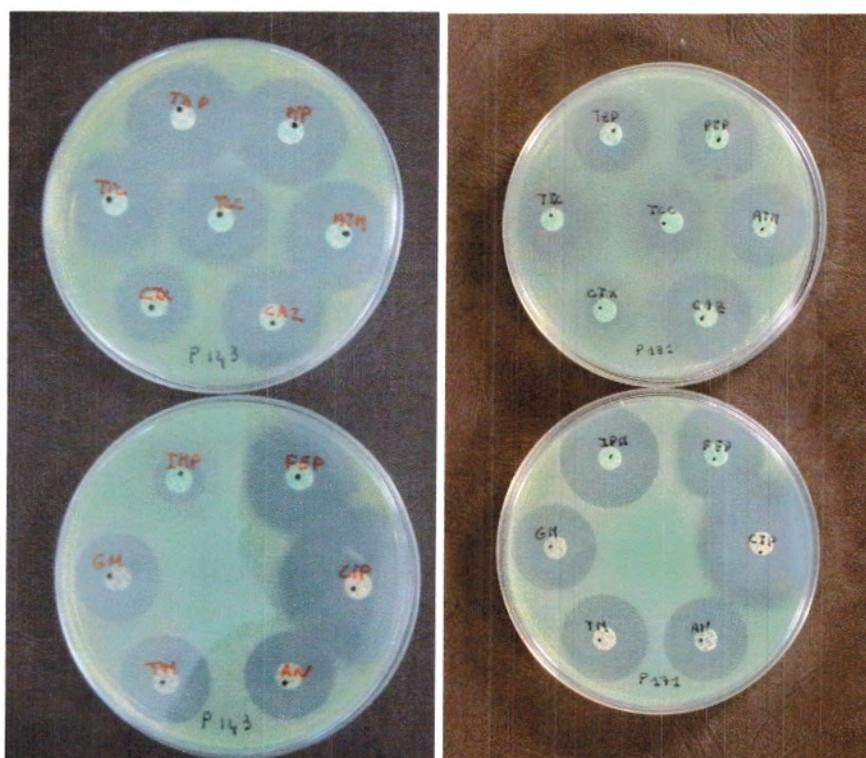
**Annexe 7. Solution et tampon pour l'électrophorèse de l'ADN plasmidique  
(Sambrook et Russel., 2001)**

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>	
<b>Tampon TBE 5X</b>	Tris base	54 g
	Acide borique	27,5 g
	EDTA 0,5 M	2 ml
	Eau distillée	qsp 1 litre
<b>Tampon de charge</b>	Glycérol	3 ml
	Bleu de bromophénol	75 mg
	Eau distillée	7 ml

## Annexe 8. Résultats d'antibiogramme

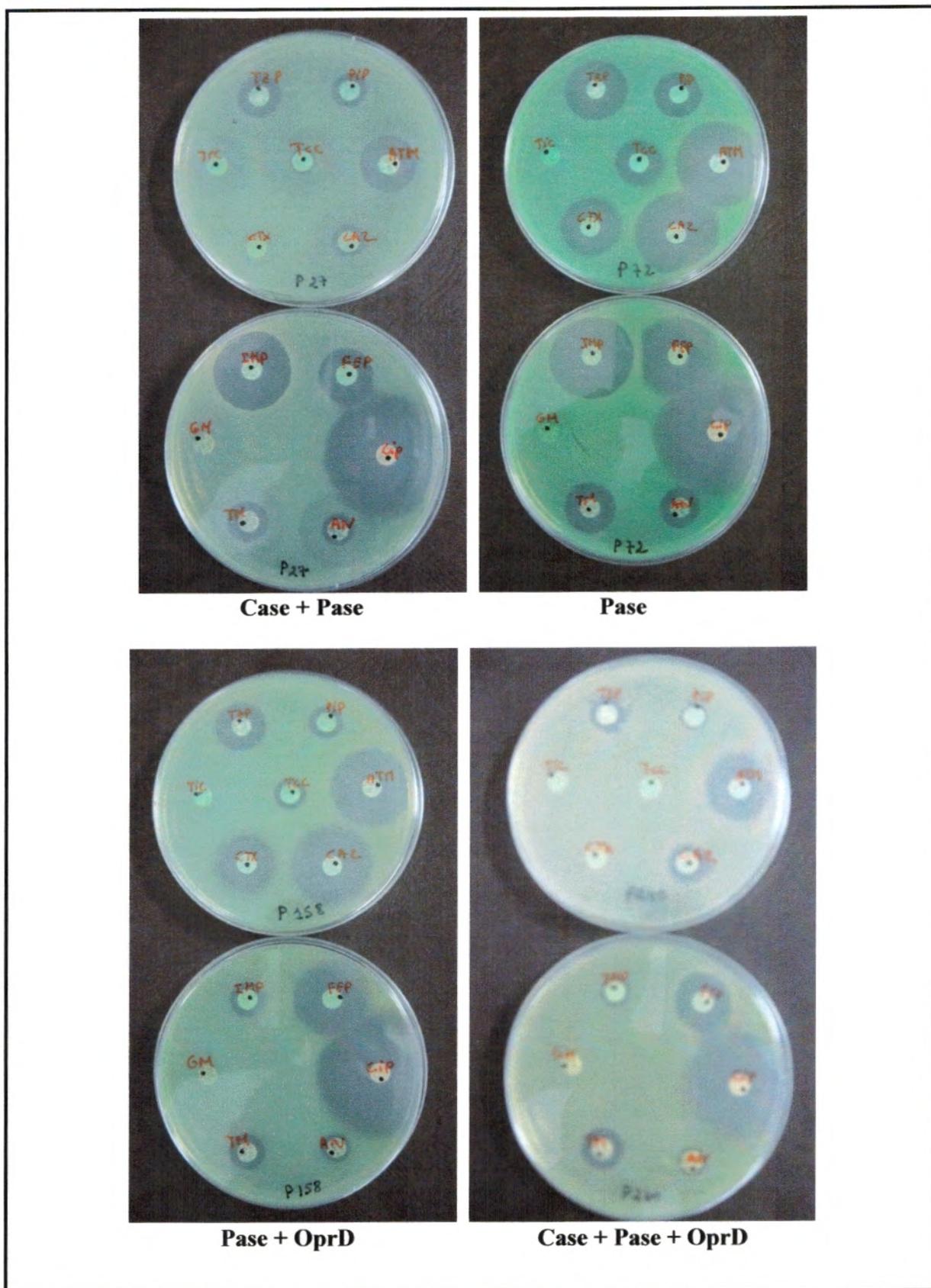
8.1 Phénotypes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines

ATCC 27853



Perte OprD

Efflux MexAB-OprM

8.2 Phénotypes de résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines

Annexe 9. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les souches de Neurochirurgie

## 9.1 Bétalactamines

	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	PIP $\leq 16 > 64$	TAZ $\leq 16 > 64$	CTX $\leq 4 > 32$	CAZ $\leq 4 > 32$	FEP $\leq 4 > 32$	ATM $\leq 4 > 32$	IPM $\leq 4 > 8$	Phenotype de résistance
A27853	16	16	2	2	8	1	2	4	4	Sauvage
P1	16	16	4	4	8	1	1	4	4	Sauvage
P2	8	8	2	2	4	1	1	2	4	Sauvage
P3	16	16	4	4	16	1	2	4	8	Perte OprD
P4	16	16	2	2	8	1	1	2	8	Perte OprD
P5	8	8	2	2	8	1	1	4	8	Perte OprD
P6	16	16	8	8	8	0,5	2	2	4	Sauvage
P7	8	8	2	2	4	1	1	4	8	Perte OprD
P18	8	8	1	2	8	1	1	2	8	Perte OprD
P19	16	16	2	2	16	1	1	2	8	Perte OprD
P20	8	8	1	2	4	0,5	1	2	8	Perte OprD
P21	128	128	8	8	64	4	4	16	4	Efflux
P22	32	32	4	4	16	2	2	8	4	Efflux
P24	64	32	4	4	16	2	2	8	4	Efflux
P29	16	8	2	2	8	0,5	1	2	8	Perte OprD
P30	16	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	Perte OprD
P31	16	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	Perte OprD
P34	16	8	4	2	8	0,5	0,5	2	8	Perte OprD
P48	32	32	4	4	16	2	2	8	2	Efflux
P49	32	32	4	4	16	2	2	8	2	Efflux
P52	32	32	4	4	16	2	2	8	2	Efflux
P68	64	64	16	16	64	4	8	32	4	Efflux
P72	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	Pase
P78	128	128	16	16	64	4	4	16	4	Efflux
P79	32	32	8	4	16	2	2	8	4	Efflux
P80	8	8	2	2	4	1	1	1	8	Perte OprD
P84	8	8	2	2	4	1	1	1	8	Perte OprD
P88	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	Pase
P89	8	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	Perte OprD
P92	8	8	2	2	4	1	1	2	8	Perte OprD
P96	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	Perte OprD
P104	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	Perte OprD

	TIC ≤16>64	TCC ≤16>64	PIP ≤16>64	TAZ ≤16>64	CTX ≤4>32	CAZ ≤4>32	FEP ≤4>32	ATM ≤4>32	IPM ≤4>8	Phenotype de résistance
<b>P105</b>	8	8	2	2	4	1	1	2	16	<b>Perte OprD</b>
<b>P108</b>	>512	256	128	32	16	1	4	4	2	<b>Pase</b>
<b>P110</b>	64	256	32	32	512	32	16	32	1	<b>Case</b>
<b>P116</b>	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P120</b>	16	16	2	2	8	1	2	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P122</b>	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P123</b>	16	16	4	4	16	2	2	4	16	<b>Perte OprD</b>
<b>P128</b>	8	8	2	2	8	0,5	1	2	4	<b>Sauvage</b>
<b>P129</b>	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P135</b>	8	8	2	2	16	1	1	4	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P136</b>	16	16	2	2	16	1	1	4	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P140</b>	8	8	2	2	8	1	1	4	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P143</b>	16	16	4	4	16	2	4	4	16	<b>Perte OprD</b>
<b>P158</b>	>512	128	128	32	16	2	2	4	16	<b>Pase + Perte OprD</b>
<b>P175</b>	16	16	4	4	16	2	2	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P214</b>	16	16	4	4	16	1	1	2	2	<b>Sauvage</b>
<b>P232</b>	16	16	2	2	8	1	0,5	2	4	<b>Sauvage</b>
<b>P238</b>	>512	256	512	128	512	16	32	16	32	<b>Case + Pase + Perte OprD</b>
<b>P239</b>	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	<b>Case + Pase + Perte OprD</b>
<b>P240</b>	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	<b>Case + Pase + Perte OprD</b>
<b>P241</b>	>512	256	>512	128	>512	16	16	16	32	<b>Case + Pase + Perte OprD</b>
<b>P242</b>	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	<b>Case + Pase + Perte OprD</b>

## 9.2 Aminosides et Fluoroquinolone

	Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines	Aminosides			Fluoroquinolone
		GEN $\leq 4 > 8$	TOB $\leq 4 > 8$	AMI $\leq 8 > 16$	CIP $\leq 1 > 2$
A27853	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P1	Sauvage	2	1	2	0,5
P2	Sauvage	0,5	1	0,5	0,5
P3	Perte OprD	256	4	2	0,25
P4	Perte OprD	256	4	1	0,25
P5	Perte OprD	256	4	1	0,25
P6	Sauvage	2	1	2	0,25
P7	Perte OprD	128	4	1	0,25
P18	Perte OprD	>512	256	2	0,25
P19	Perte OprD	256	4	2	0,25
P20	Perte OprD	128	4	2	0,25
P21	Efflux	1	0,5	1	0,5
P22	Efflux	2	1	2	0,25
P24	Efflux	2	1	2	0,25
P29	Perte OprD	512	128	1	0,25
P30	Perte OprD	256	4	1	0,25
P31	Perte OprD	128	4	2	0,25
P34	Perte OprD	256	4	1	0,25
P48	Efflux	1	1	2	0,25
P49	Efflux	0,5	0,5	2	0,25
P52	Efflux	1	1	2	0,25
P68	Efflux	2	0,5	4	0,5
P72	Pase	>512	8	64	0,25
P78	Efflux	2	0,5	2	0,5
P79	Efflux	2	0,5	2	0,25
P80	Perte OprD	512	4	2	0,25
P84	Perte OprD	128	4	1	0,25
P88	Pase	>512	8	64	0,25
P89	Perte OprD	256	4	2	0,25
P92	Perte OprD	256	1	1	1
P96	Perte OprD	256	2	1	0,25
P104	Perte OprD	256	2	1	0,25
P105	Perte OprD	1	0,25	1	2

	Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines	Aminosides			Fluoroquinolone
		GEN $\leq 4 > 8$	TOB $\leq 4 > 8$	AMI $\leq 8 > 16$	CIP $\leq 1 > 2$
P108	Pase	>512	8	64	0,25
P110	Case	2	1	4	0,25
P116	Perte OprD	256	4	2	0,25
P120	Sauvage	256	4	1	0,25
P122	Perte OprD	256	4	1	0,25
P123	Perte OprD	1	0,5	2	0,25
P128	Sauvage	256	4	2	0,25
P129	Perte OprD	256	4	2	0,25
P135	Perte OprD	256	4	2	0,25
P136	Perte OprD	256	4	2	0,25
P140	Perte OprD	256	4	2	0,25
P143	Perte OprD	2	0,5	4	0,25
P158	Pase + Perte OprD	>512	16	128	0,25
P175	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P214	Sauvage	2	1	4	0,25
P232	Sauvage	1	0,5	1	0,5
P238	Case + Pase + Perte OprD	128	8	32	0,5
P239	Case + Pase + Perte OprD	>512	16	128	0,25
P240	Case + Pase + Perte OprD	>512	8	128	0,5
P241	Case + Pase + Perte OprD	>512	16	128	0,5
P242	Case + Pase + Perte OprD	>512	16	32	0,5

Annexe 10. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les souches de Traumatologie

## 10.1 Bétalactamines

	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	PIP $\leq 16 > 64$	TAZ $\leq 16 > 64$	CTX $\leq 4 > 32$	CAZ $\leq 4 > 32$	FEP $\leq 4 > 32$	ATM $\leq 4 > 32$	IPM $\leq 4 > 8$	Phenotype de résistance
A27853	16	16	2	2	8	1	2	4	4	Sauvage
P27	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	Case + Pase
P28	64	16	4	4	16	2	2	8	4	Efflux
P35	32	16	4	4	16	2	2	8	4	Efflux
P38	16	8	2	2	4	0,5	0,5	2	16	Perte OprD
P39	16	8	2	2	8	1	1	2	8	Perte OprD
P42	16	16	4	4	16	2	1	4	4	Sauvage
P43	128	128	8	8	64	2	8	16	4	Efflux
P55	8	8	4	4	8	1	1	4	8	Perte OprD
P56	8	8	4	2	4	1	1	2	8	Perte OprD
P59	8	8	2	4	16	1	4	4	2	Sauvage
P67	8	8	4	4	8	1	1	4	16	Perte OprD
P69	8	8	4	2	8	1	1	2	8	Perte OprD
P70	8	8	4	2	8	1	1	4	16	Perte OprD
P71	8	8	4	2	8	1	1	4	16	Perte OprD
P82	16	16	2	2	8	1	1	1	16	Perte OprD
P85	32	32	8	8	32	4	4	8	1	Efflux
P86	32	32	4	4	16	2	2	8	4	Efflux
P97	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	Perte OprD
P98	8	8	2	2	8	1	1	2	2	Sauvage
P100	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	Perte OprD
P101	8	8	2	2	4	0,5	1	2	2	Sauvage
P102	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage
P106	8	8	2	2	8	1	1	2	1	Sauvage
P107	16	16	2	2	8	1	2	4	2	Sauvage
P111	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	Perte OprD
P115	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	Perte OprD
P121	32	32	8	8	32	4	4	8	2	Efflux
P124	32	32	16	16	64	4	4	8	2	Efflux
P127	16	16	2	2	8	1	1	4	8	Perte OprD
P146	16	16	4	4	16	2	4	4	1	Sauvage
P147	16	16	4	4	16	2	4	4	2	Sauvage

	TIC ≤16>64	TCC ≤16>64	PIP ≤16>64	TAZ ≤16>64	CTX ≤4>32	CAZ ≤4>32	FEP ≤4>32	ATM ≤4>32	IPM ≤4>8	Phenotype de résistance
<b>P148</b>	>512	64	128	16	16	2	2	4	2	<b>Pase</b>
<b>P152</b>	16	16	4	4	16	1	4	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P153</b>	16	16	4	4	8	1	2	4	8	<b>Perte OprD</b>
<b>P163</b>	16	16	4	4	16	2	4	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P164</b>	16	16	4	4	16	1	4	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P165</b>	64	64	4	4	32	2	4	16	2	<b>Efflux</b>
<b>P170</b>	16	16	4	4	16	2	4	4	2	<b>Sauvage</b>
<b>P213</b>	16	16	4	4	8	2	0,5	2	4	<b>Sauvage</b>
<b>P226</b>	8	8	2	2	8	1	1	1	2	<b>Sauvage</b>
<b>P227</b>	16	16	4	4	16	1	2	2	4	<b>Sauvage</b>
<b>P231</b>	16	16	4	4	16	1	1	2	2	<b>Sauvage</b>

## 10.2 Aminositides et Fluoroquinolone

	Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines	Aminosides			Fluoroquinolone
		GEN $\leq 4 > 8$	TOB $\leq 4 > 8$	AMI $\leq 8 > 16$	CIP $\leq 1 > 2$
A27853	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P27	Case + Pase	64	8	32	0,25
P28	Efflux	1	0,5	2	0,25
P35	Efflux	1	0,5	2	0,25
P38	Perte OprD	128	4	1	0,25
P39	Perte OprD	1	0,5	2	0,25
P42	Sauvage	0,5	0,5	1	0,25
P43	Efflux	1	1	8	0,5
P55	Perte OprD	256	4	2	0,25
P56	Perte OprD	128	4	1	0,25
P59	Sauvage	2	1	4	0,25
P67	Perte OprD	512	8	1	0,25
P69	Perte OprD	128	2	2	0,25
P70	Perte OprD	256	4	2	0,25
P71	Perte OprD	256	4	1	0,25
P82	Perte OprD	256	4	1	0,25
P85	Efflux	2	1	4	0,25
P86	Efflux	1	0,5	2	0,25
P97	Perte OprD	128	2	1	0,25
P98	Sauvage	128	2	1	0,25
P100	Perte OprD	128	2	1	0,25
P101	Sauvage	128	2	1	0,25
P102	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P106	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P107	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P111	Perte OprD	1	0,5	1	0,25
P115	Perte OprD	1	0,5	2	0,25
P121	Efflux	2	1	4	0,25
P124	Efflux	2	2	4	0,25
P127	Perte OprD	>512	16	2	0,25
P146	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P147	Sauvage	1	0,5	2	0,25

	Phénotype de résistance aux $\beta$ -lactamines	Aminosides			Fluoroquinolone
		GEN $\leq 4 > 8$	TOB $\leq 4 > 8$	AMI $\leq 8 > 16$	CIP $\leq 1 > 2$
P148	Pase	>512	8	64	0,25
P152	Sauvage	2	1	4	0,25
P153	Perte OprD	256	4	2	0,25
P163	Sauvage	2	1	4	0,25
P164	Sauvage	2	1	4	0,25
P165	Efflux	2	0,5	2	0,5
P170	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P213	Sauvage	2	1	4	0,25
P226	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P227	Sauvage	1	0,5	2	0,5
P231	Sauvage	2	2	1	0,5

Annexe 11. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les Transconjugants

	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	PIP $\leq 16 > 64$	TAZ $\leq 16 > 64$	CTX $\leq 4 > 32$	CAZ $\leq 4 > 32$	FEP $\leq 4 > 32$	ATM $\leq 4 > 32$	IPM $\leq 4 > 8$	GEN $\leq 4 > 8$	TOB $\leq 4 > 8$	AMI $\leq 8 > 16$	CIP $\leq 1 > 2$
<b>CIP R</b>	32	32	16	16	16	2	8	8	2	2	1	2	2
<b>27</b>	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	64	8	32	0.25
<b>T27</b>	>512	128	128	32	16	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>72</b>	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	>512	8	64	0.25
<b>T72</b>	>512	128	64	32	16	2	8	8	2	256	8	64	2
<b>88</b>	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	>512	8	64	0.25
<b>T88</b>	>512	128	64	32	16	2	8	8	2	256	8	64	2
<b>108</b>	>512	256	128	32	16	1	4	4	2	>512	8	64	0.25
<b>T108</b>	>512	128	128	32	16	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>148</b>	>512	64	128	16	16	2	2	4	2	>512	8	64	0.25
<b>T148</b>	>512	64	128	16	16	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>158</b>	>512	128	128	32	16	2	2	4	16	>512	16	128	0.25
<b>T158</b>	>512	128	128	32	16	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>239</b>	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	>512	16	128	0,25
<b>T239</b>	>512	128	128	32	16	2	8	8	2	512	8	64	2

*Pseudomonas aeruginosa* ممرض انتهازى، يجمع العديد من آليات المقاومة لمضادات الجراثيم، يفرض بهذا مراقبة منتظمة لفعاليتهم *in vitro*. فى هذه الدراسة، الحساسية إلى تسعة  $\beta$ -لاكتامين، ثلاثة أمينوزيد و واحد فليوروكينولون قدرت ل 95 عينة معزولة من 250 أخذ و ذلك فى مصلحتنا جراحة الأعصاب و العظام بمستشفى تلمسان. مراقبة طبع المقاومات ل $\beta$ -لاكتامين، سمحت بتقدير فعاليتهم حسب أنواع تعبير *Pseudomonas aeruginosa* و تبين المقومات المشتركة إلى أسر مضادات الجراثيم الأخرى المدروسة. أجري على العينات التي أظهرت طبع مقاومة من المحتمل مرتبط باقتناء جينات خارجية اختبار تحويل المقاومة متبوع بمشاهدة المضمون البلاسميدي بالآلكتروفوراز على هلام الأكاروز.

**كلمات مفتاحية :** *Pseudomonas aeruginosa* - المقاومة لمضادات الجراثيم - طبع المقاومة ل $\beta$ -لاكتامين - تحويل المقاومة - آلكتروفوراز على هلام الأكاروز.

## RESUME

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui cumule de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques, imposant une analyse régulière de leur activité *in vitro*. Dans cette étude, la sensibilité à neuf  $\beta$ -lactamines, trois aminosides et une fluoroquinolone a été évaluée pour 95 souches isolées à partir de 250 prélèvements au niveau des services de Neurochirurgie et de Traumatologie du C.H.U. de Tlemcen. L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines a permis d'apprécier leur efficacité en fonction des différents modes d'expression de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* et de mettre en évidence les résistances associées aux autres familles d'antibiotiques testées. Les souches présentant un phénotype de résistance lié probablement à l'acquisition de gènes extérieurs ont fait l'objet d'un test de conjugaison suivi d'une visualisation du contenu plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose.

### MOTS CLES :

*Pseudomonas aeruginosa* - résistance aux antibiotiques - phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines - conjugaison - électrophorèse sur gel d'agarose.

## SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen which holds a plurality of resistance mechanisms to antibiotics enforcing a regular analysis of their activity *in vitro*. In this study, susceptibility to nine  $\beta$ -lactams, three aminosides and one fluoroquinolone has been valued for 95 strains from 250 samples in Neurosurgery and Traumatology units of Tlemcen C.H.U. The analysis of resistance phenotypes to  $\beta$ -lactam has allowed to estimate their efficacy according to different modes of expression of *Pseudomonas aeruginosa* resistance and to display associated resistance to the other tested antibiotics families. The strains which present a resistance phenotype probably bound to the acquisition of external genes were subject of a conjugation test followed by a visualization of plasmidic content by agarose gel electrophoresis.

### KEY WORDS:

*Pseudomonas aeruginosa* - antibiotics resistance - resistance phenotypes to  $\beta$ -lactam - conjugation - agarose gel electrophoresis.