

1149/274-09/03.
République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et De La Recherche Scientifique

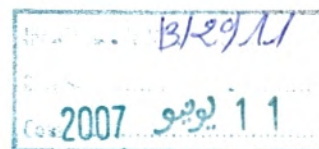
111 / 132 / 01
Université Abou Bekr Belkaid
Faculté Des Sciences
Département de Biologie
Laboratoire De Recherche: Produits Naturels

Mémoire de Magister

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie
Option: Substances naturelles: "Activités Biologiques et Synthèses"

Présenté par: M^{elle} LAGHA NOURIA

Thème:



Contribution à l'étude de la résistance aux Antibiotiques Et aux Huiles Essentielles de bactéries d'origines hospitalières

Membres du Jury:

Président: M^r. TALEB BENDIAB S.A.

Professeur

Examineurs: M^r. MOUSSAOUI A.

Maître de conférence

M^{me} ATIK BEKKARA F.

Maître de conférence

Promoteur: M^r. ABDELOUAHID D.E.

Maître de conférence

Co-promotrice: M^{me} HASSAÏNE TERKI HASSAÏNE H. Chargée de cours

Année Universitaire : 2006 – 2007

DEDICACE

Ce mémoire est particulièrement dédié à mes parents, mes meilleurs amis, ceux qui ont su s'intéresser à mes travaux, m'encourager et me conseiller au cours des épreuves les plus ardues.

J'aimerais remercier mes frères et mes sœurs, pour leur support continu et attention.

Enfin. Je voudrais aussi remercier mes Amies Nadia et Houaria, sans oublier M^{me} HASSAÏNE T. H. H. Pour leur support et leurs encouragements durant cette période de maîtrise.

Mille mercis,

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier, en premier Lieu, mon directeur de recherche Monsieur ABDELOUAHID D.E. Maître de conférence à la faculté des sciences de Tlemcen, Département de Biologie de m'avoir accepté la direction de ce mémoire, pour l'aide et les conseils précieux qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Je voudrais remercier de façon particulière Madame HASSAÏNE TERKI HASSAÏNE H. Chargée de cours à la faculté des sciences de Tlemcen, Département de Biologie, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Elle a su par sa confiance, ses conseils et son aide de diriger et faciliter l'exécution de mes travaux.

Je tiens à remercier vivement monsieur TALEB BENDIAB S.A. Professeur à la faculté des sciences de Tlemcen, pour avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur MOUSSAOUI A. Maître de conférence à la faculté des sciences de Tlemcen, pour avoir accepté de participer au jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame ATTIK BEKKARA F. Maître de conférence à la faculté des sciences de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur BAKOUR R. Professeur à la faculté des sciences d'Alger, Département de Biologie (FSB/USTHB) et Monsieur IABADENE H. Chargé de cours à la même faculté qui m'ont apporté une aide précieuse dans l'application pratique des méthodes moléculaire de ce travail et pour m'avoir accordé la chance de faire partie de son équipe.

Je tiens à remercier Monsieur BENDAHOU M., Chargée de cours à la faculté des sciences de Tlemcen, Département de Biologie, pour m'avoir donné les huiles essentielles testé dans ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur et Madame BENHADDOUCHE médecin chef pour m'avoir accueilli et accepté de faire des prélèvements bactériologiques; ainsi pour leurs conseils et l'intérêt qu'ils ont porté à ma formation.

Je tiens ici à remercier sincèrement tous les personnels du service de réanimation C.H.U de Tlemcen surtout M^{elle} BENSNANE M. médecin spécialiste et les infirmiers Monsieur BEKHTI, M^{elle} FOUZIA et FATIHA pour leur support et bon temps passé ensemble.

Ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à cette étude.

Résumé

L'étude de 158 souches des germes Gram négatifs isolées en milieu hospitalier chez les patients hospitalisés à long séjour dans le service de réanimation du CHU Tlemcen entre décembre et avril 2006, montre que les Entérobactéries occupent la première place dans les prélèvements rectaux, dont les *Klebsiella sp* et les *Enterobacter sp* représentent les principaux germes isolés soit 29% et 24%. Contrairement aux prélèvements des sondes d'intubation, où le genre *Pseudomonas* est le germe prédominant avec 68%.

L'évolution de la résistance aux antibiotiques a été établie par la méthode de diffusion en gélose, selon les normes du Comité français pour l'antibiogramme. Cette résistance a été marquée par une émergence des entérobactéries résistantes aux céphalosporines et à la majorité des ATB sauf l'imipénème qui reste l'antibiotique de choix avec 100% des souches sensibles.

En effet, les antibiotiques actifs sur les bacilles pyocyaniques et les *Acinetobacter sp* sont la tobramycine et l'amikacine parmi les aminosides; la ceftazidime, la pipéracilline et l'imipénème parmi les B-lactamines.

L'étude du portage digestif des Entérobactéries productrices de B-lactamase à spectre étendue (BPBLSE) dans notre hôpital, a montré que la colonisation était fréquente (22.47%) et que parmi les BPBLSE isolées, *Klebsiella pneumoniae* était la plus fréquente (65%), suivi par *Enterobacter cloacae* (25%) et *E.coli* (10%).

La recherche des plasmides par la lyse alcaline montre que les cinq souches hébergent des plasmides de poids moléculaire 60 kb. Donc, les gènes des BLSE sont généralement portés par des plasmides transférables.

Pour le pouvoir antimicrobien des huiles testées, cette étude montre que l'huile essentielle de *Thymus capitatus* révèle une meilleure activité biologique que l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* contre la majorité de souches d'Entérobactéries et *Acinetobacter* testées.

En effet, les souches *Pseudomonas aeruginosa* montrent une résistance élevée, même à des concentrations > 14775µg/ml.

Mots-clés: Entérobactéries – Epidémiologie – B-lactamases à spectre étendu – Bactéries Gram (-) – Résistance aux antibiotiques – recherche des plasmides – *Thymus capitatus* (L) Hoffm et Link – *Ammoides verticillata* – Pouvoir antibactérien.

SOMMAIRE

Introduction

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

Synthèse Bibliographique

<i>I. La résistance aux antibiotiques</i>	3
1- Origine de la résistance.....	3
1-1- Résistance par mutations.....	3
1 -2- Résistance suite au transfert génétique.....	4
2- Types de résistance.....	4
2-1- Résistance naturelle ou intrinsèque.....	4
2-2- Résistance acquise.....	4
3- Principaux mécanismes de résistance.....	4
3-1- Diminution de l'entrée d'un antibiotique ou imperméabilité.....	5
3-2- Mécanisme d'efflux actif.....	6
3-3- "Bypass".....	6
3-4- Modification de la cible.....	6
3-5- Inhibition enzymatique de l'activité d'un antibiotique.....	7
3-5-1- Inactivation enzymatique d'un antibiotique.....	7
3-5-2- Modification enzymatique d'un antibiotique.....	7
<i>II. Résistance aux B-lactamines</i>	7
1- Les B-lactamines.....	7
2- Les niveaux de résistance.....	8
3- Production de B-lactamases.....	8
3-1- Définition des B-lactamases.....	8
3-2- Mode d'action.....	8
3-3- Classification.....	9
3-3-1- Classification de Bush.....	9
3-3-2- Classification d'Ambler.....	11
3-3-2-1- Les β -lactamases de classe A.....	11
3-3-2-2- Les β -lactamases de classe B.....	13
3-3-2-3- Les β -lactamases de classe C.....	13
3-3-2-4- Les β -lactamases de classe D.....	14
4- Diminution de l'entrée des β -lactamines.....	14
5- Altération des PLPs ou modification de la cible.....	14

III. Les Entérobactéries productrices de BLSE.....	15
1- L'historique.....	15
2- B-lactamases à spectre étendue: BLSE.....	16
2-1- Caractéristiques générales sur les BLSE.....	16
2-2- Caractéristiques moléculaires des BLSE.....	16
2-3- Nouvelles BLSE.....	18
2-3-1- Généralité.....	18
2-3-2- Classification.....	19
3- Epidémiologie clinique des Entérobactéries productrices de BLSE	19
3-1- Réservoirs.....	19
3-2- Modes de transmission.....	20
3-3- Facteurs de risque.....	20
IV. Les Huiles Essentielles.....	21
1-Définition.....	21
2- La répartition et localisation des huiles essentielles.....	21
3- La fonction des huiles essentielles.....	22
4- Composition chimique.....	22
5- Les techniques d'obtention des huiles essentielles.....	22
5-1- Distillation à l'eau ou "hydrodistillation".....	22
5-2- Distillation à la vapeur d'eau dans un alambic à double fond : "Vapo-hydrodistillation".....	23
5-3- Distillation à la vapeur directe : "générateur séparé" ou "vapodistillation".....	23
5-4- L'expression à froid.....	23
5-5- Autres techniques.....	23
5-5-1- L'extraction par solvant.....	23
5-5-2- L'extraction par le dioxyde de carbone (CO2).....	24
5-5-3- L'extraction assistée par micro-ondes	24
6- Domaines d'utilisation	24
6-1- En pharmacie.....	25
6-2- En parfumerie.....	25
6-3- Dans les industries agroalimentaires	25
7- La Phytothérapie.....	26
7-1- Définition.....	26
7-2- Utilité de Phytothérapie.....	26
8- L'aromathérapie.....	27
8-1- Définition.....	27
8-2- Utilité de l'aromathérapie.....	27
9- Toxicité des huiles essentielles.....	27
V. Les plantes utilisées dans cette étude.....	28
1- <i>Thymus capitatus</i>	28
1-1- Description botanique.....	28
1-2- Classification.....	28

1-3- Propriétés.....	29
2- <i>Ammoides verticillata</i>	29
2-1- Description botanique.....	29
2-2- Classification.....	29
1-3- Propriétés.....	30

Matériels et Méthodes

I. Patients et prélèvements	31
1- Le choix de service de la réanimation.....	31
2- Patients	31
3- Prélèvements.....	31
4- Ensemencement	32
5- Isolement et purification	32
II. L'identification des germes isolés	32
1- Galerie API 20E.....	32
2- Galerie API 20NE.....	33
III. L'antibiogramme	34
IV. Tests de détection des BLSE	37
1- Test de synergie.....	37
2- Test du double disque : (appelé aussi test espagnol).....	38
V. Etude moléculaire des germes isolés	39
1- Transfert génétique par conjugaison.....	39
2- Extraction d'ADN plasmidique par la méthode de Kado et Liu	40
3- Electrophorèse d'ADN plasmidique.....	40
VI. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	44
1- Extraction des huiles essentielles.....	44
2- Souches microbiennes testées.....	44
3- Méthode de Vincent.....	44
4- Méthode de contact direct	45
5- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	46
6- Etude du pouvoir antibactérien pour les combinaisons.....	46
6-1- Pouvoir antibactérien de la combinaison "Antibiotiques-Huiles essentielles"	46
6-2- Pouvoir antibactérien de la combinaison "Huile essentielle – Huile essentielle"	46

Résultats Et Interprétation

I. Identification de souches	47
II. Sensibilité de souches aux Antibiotiques	51
1- Entérobactéries.....	51

1-1- Par rapport à l'ensemble des Entérobactéries étudiées.....	51
1-2- Par rapport aux genres bactériens	52
2- <i>Pseudomonas</i>	57
3- <i>Acinetobacter</i>	59
III. Détection de B-lactamases à spectre étendue chez les souches sauvages.....	60
IV. La conjugaison.....	64
V. Isolement des plasmides.....	67
VI. Effet antibactérien des huiles essentielles.....	69
1- Méthode de Vincent.....	69
2- Méthode de contact direct.....	71
3- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	72
4- Etude du pouvoir antibactérien par combinaisons.....	72
4-1- Combinaisons : Antibiotiques – Huiles essentielles.....	72
4-2- Combinaisons : Huile essentielle – Huile essentielle.....	74

Discussion

<i>Discussion</i>	75
-------------------------	----

Conclusion

<i>Conclusion</i>	84
-------------------------	----

Références Bibliographique

<i>Références Bibliographique</i>	87
---	----

Annexes

<i>Annexes</i>	106
----------------------	-----

ABREVIATIONS

A: Acinetobacter baumannii

Ae: Autre entérobactéries

ATB: Antibiotique

BET: Bromure d'éthidium

BHIB : Bouillon cœur cervelle

BLSE: B-lactamase à spectre étendue

C°: degré Celsius

CMI: Concentration minimale inhibitrice

E: Escherichia coli

EBLSE: Entérobactéries productrices des B-lactamases à spectre étendue

EDTA: acide éthylène diamine tétracétique

En: Enterobacter sp

h : heure

HE: huile essentielle

IPP: Institut Pasteur de Paris

g : gramme

I : intermédiaire

K: Klebsiella sp

kb : kilo paire de bases

µg : microgramme

µl : microlitre

M : molaire

MH : Muller – Hinton

ml : millilitre

mm : millimètre

mn : minute

P: Pseudomonas sp

pb : paire de bases

PM : poids moléculaire

R : Résistant

S : Sensible

TC : transconjugant

TE : Tris EDTA

TEM : abréviation de nom du malade TEMONIERA chez qui a été isolée la 1^{ère} souche bactérienne productrices d'une B-lactamase de ce type.

trs : tours

UV: Ultra Violet

Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques a augmenté dans des proportions inquiétantes ces dernières années et est devenue un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, mettant en jeu la validité de l'arsenal thérapeutique.

De plus, les centres d'hospitalisation de longue durée sont souvent considérés comme des réservoirs de patients porteurs de BMR (bactéries multirésistantes) **(Bradley. 1999)**.

Cette résistance bactérienne est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part. Elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale. Les bactéries pour faire face à la pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisent des parades leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement **(Ben redjeb et al. 2000)**.

Parmi les mécanismes utilisés, il y a les mutations chromosomiques mais essentiellement l'acquisition d'informations génétiques nouvelles (plasmides ou transposons) à partir d'une bactérie résistante appartenant à la même espèce ou à une autre espèce, la bactérie peut alors à son tour devenir résistante à plusieurs antibiotiques en même temps. La dissémination des résistances liée à la circulation des gènes entre les bactéries rend compte ainsi de la rapidité avec laquelle évolue le phénomène de la résistance au sein du monde bactérien **(Ploy et al. 2000 ; Davies. 1994)**.

La résistance aux *B*-lactamines dont les céphalosporines de 3^{ème} génération par production d'une B-lactamase à spectre étendue (BLSE) est un problème mondial rapporté dans les cinq continents. Les gènes des BLSE sont généralement portés par des plasmides transférables **(Branger et al. 1998)**.

Cette résistance a été décrite chez de nombreuses espèces d'entérobactéries et fréquemment chez *Klebsiella pneumoniae* **(Sirot. 1996)**. Ces bactéries productrices de BLSE (BPBLSE) constituent actuellement une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques. Le portage digestif des patients est un réservoir de BPBLSE et la dissémination des souches est essentiellement manuportée **(Decré et al. 2000)**.

La thérapeutique de ces infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments.

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire (**Baudoux. 2000**).

Différentes études récentes ont confirmé, in vitro, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles (**Hammer et Carson. 1999 ; Cassella et Cassella. 2002**) comme l'huile essentielle de *Thymus capitatus* et d'*Ammoides verticillata* (**Ultee et al. 2000 ; Laouer et al. 1998**).

Il est largement utilisé en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Il est préconisé, entre autres, dans le traitement des diarrhées, des infections respiratoires, cutanées et urinaires ...etc (**Bellakhdar. 1997**).

Donc, notre travail est une étude fondamentale visant à pour but de faire le point sur:

- la situation épidémiologique des germes Gram (-) au niveau des sondes d'intubation et du portage digestif chez les patients hospitalisés à long séjour dans le service de réanimation du C.H.U Tlemcen.
- Le profil de résistance de souches isolées vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques testées.
- La détection de production de *B*-lactamases à spectre étendue chez les souches d'entérobactéries.
- La recherche des plasmides chez quelques souches d'entérobactéries productrices de *B*-lactamases à spectre étendue.
- la détermination qualitative et quantitative de l'action antibactérienne in vitro des huiles essentielles du *Thymus capitatus* et d'*Ammoides verticillata* vis à vis de souches multirésistantes provenant de malades souffrant à long séjour.

Ceci permettrait aux cliniciens d'ajuster les attitudes thérapeutiques et préventives, et d'éviter l'émergence de souches bactériennes multirésistantes.

Synthèse
Bibliographique

I. La résistance aux antibiotiques:

La résistance aux antibiotiques est un problème mondial qui ne connaît pas de frontières. Elle est due à l'avènement des antibiotiques en médecine où la production et l'usage en grande quantité ont contribué à la sélection de bactéries qui possèdent des gènes de résistance.

Dans le contexte d'utilisation de ces molécules, quelques points importants sont à décrire. Nous retrouvons des personnes qui cessent un traitement aux antibiotiques avant le temps. Ceci permet aux bactéries sensibles d'être éliminées et laisse place aux souches résistantes leur permettant de se multiplier. En clinique, nous retrouvons l'application de doses inadéquates d'antibiotiques amenant une concentration de l'antibiotique inférieure aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) et aux concentrations sériques inappropriées pour permettre l'élimination du pathogène en question. Cette concentration inférieure exerce une pression sélective permettant l'apparition de clones résistants qui existaient déjà dans la population bactérienne (**Amyes et Gemmell. 1992**).

1- Origine de la résistance:

Dès le début des années 1900, il a été reconnu que la résistance aux drogues posait un sérieux problème quant à l'utilisation clinique d'agents chimiothérapeutiques.

Au cours des années suivantes, il fut démontré, à une exception près, que tout organisme a le potentiel de conférer une résistance et ce, à n'importe quelles drogues. Ce phénomène de résistance aux agents chimiothérapeutiques, chez un pathogène, peut se résumer de deux façons: a) suite à l'apparition de mutations; ou b) transfert génétique d'une bactérie à une autre (**Mass. 1986**).

1-1- Résistance par mutations:

Différents concepts et idéologies se sont disputés l'origine du phénomène de résistance aux drogues par mutations. Jusqu'au début des années 1940, la théorie Lamarquiste suggérait que la présence d'une drogue induisait directement l'émergence d'une souche résistante à celle-ci. Cette idéologie de "résistance spontanée" fut aussitôt rejetée par les expériences de **Luria et Delbrück. 1943** qui démontrèrent que la mutation conférant la résistance au bactériophage T1, chez *Escherichia coli*, n'était pas induite par la présence du phage, mais que celui-ci jouait le rôle d'agent de sélection assurant la croissance de souches résistantes préexistantes. Par la suite, différents travaux (**Demerec. 1948 ; Newcombe. 1949**) ont confirmé que la résistance aux drogues ne résultait pas de la présence d'une drogue mais que celle-ci, tout comme les phages, agissait comme agent de sélection.

Toutefois, la fréquence d'apparition de souches résistantes pour une drogue versus une autre peut dépendre de différents facteurs: a) le nombre de gènes mutés requis pour induire la résistance; et b) le nombre de mutations requises dans un gène donné pour conférer la résistance (**Mass. 1986**).

1-2- Résistance suite au transfert génétique:

La résistance par transfert génétique s'explique par l'acquisition d'ADN étranger, que ce soit par conjugaison, transformation ou transduction, dont les produits de synthèse assurent la résistance à une ou plusieurs drogues. L'origine de ces mécanismes est toujours énigmatique mais semblerait avoir été impliquée dans le transfert de gènes de résistance avant même l'utilisation de composés antimicrobiens en clinique. Par exemple, la caractérisation d'une souche d'*E.coli*, isolée en 1946, a démontré la présence de gènes responsables de la résistance aux tétracyclines et à la streptomycine (Elwell et Fling. 1989). Ces gènes, retrouvés sur un plasmide de type R, pourraient provenir d'organismes à Gram-positif non pathogènes producteurs d'antibiotiques tel *Streptomyces spp* ou *Actinomyces spp*.

2- Types de résistance:

2-1- Résistance naturelle ou intrinsèque:

On connaît des résistances naturelles, programmées sur le génome bactérien, donc fixes et constantes à l'intérieur du taxon. A ce titre, elles constituent un critère d'identification. Le mécanisme de cette résistance est variable mais son support génétique est généralement chromosomique, donc soit constitutive, soit inductible. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce (Peyret. 1994).

2-2- Résistance acquise:

On connaît des résistances acquises, consécutives à des modifications de l'équipement génétique, elle fait intervenir soit un support chromosomique (mutation d'un gène de structure ou de régulation), soit un support plasmidique (transformation ou conjugaison), soit un transposon (Mayer et al. 2000).

La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance à un antibiotique par une souche normalement sensible. Elles ne concernent que quelques souches d'une même espèce mais peuvent s'étendre: leur fréquence varie dans le temps mais aussi dans l'espace - région, ville, hôpital ou même service. Elles constituent un marqueur épidémiologique.

3- Principaux mécanismes de résistance:

Avant même l'utilisation clinique de différents antibiotiques, les bactéries ont dû s'adapter et perfectionner différents mécanismes pouvant assurer leur prolifération malgré les pressions sélectives induites par l'arrivée d'une multitude de nouveaux composés antimicrobiens (Poole. 2000). Ces mécanismes ont ainsi pour fonction de contourner d'une façon ou d'une autre l'effet toxique de ces molécules (Mayer et al. 2000).

Le tableau N°1 illustre les différents types de mécanismes, leur support génétique et leur importance clinique chez les entérobactéries et les *Pseudomonas*.

Tableau N°1 : Résistance acquise des bâtonnets à Gram négatif aux antibiotiques: fréquence et exemples (Liassine. 2000).

<i>Mécanisme de Résistance</i>	<i>support génétique</i>	<i>Entérobactéries</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>inactivation enzymatique</i>	chromosome, élément mobile (plasmide, transposon)	+++ ex: β-lactamases (céphalosporinase; (BLSE)	++ ex: β-lactamases
<i>modification de cible</i>	Chromosome (mutation)	++ ex.: quinolones (mutants gyrase);	++ ex.: quinolones (mutants gyrase); β-lactamines
<i>défaut de pénétration</i>	Chromosome (mutation)	+ R. croisées possibles par altération des porines	++ R. isolées (ex.: carbapénèmes) ou croisées
<i>efflux actif</i>	Chromosome	Rare R. bas niveau	++ R. croisées possibles

+, ++, +++: importance en pratique médicale

BLSE: β-lactamase à spectre élargi

R: résistance

3-1- Diminution de l'entrée d'un antibiotique ou imperméabilité:

La diminution de l'entrée d'un antibiotique, dans l'espace intracellulaire d'une bactérie, constitue la première ligne de défense lorsqu'elle est exposée à un de ces agents toxiques. Cette propriété peut résulter en une habileté intrinsèque qu'a un groupe de bactéries à induire une résistance.

Les bactéries à Gram-négatif, par exemple, démontrent une résistance intrinsèque à la vancomycine en raison de leur imperméabilité membranaire aux molécules hydrophobes de haut poids moléculaire. Ce mécanisme de résistance peut aussi être acquis que ce soit par mutation ou transfert génétique.

L'acquisition de ce mécanisme a particulièrement été observée chez les bactéries à Gram-négatif résistantes aux tétracyclines suite à une diminution de la synthèse de la protéine membranaire, OmpF (Cohen et al. 1988). Une diminution de l'expression de cette protéine membranaire, nommée porine, provoque une diminution de l'entrée des tétracyclines.

3-2- Mécanisme d'efflux actif:

Ce type de résistance se caractérise par la capacité qu'a un organisme résistant à éliminer, ou expulser, les antibiotiques incorporés dans l'espace intracellulaire.

L'élimination subséquente de ces molécules toxiques résulte en une diminution de leurs capacités à atteindre leurs cibles.

La résistance aux tétracyclines chez différentes pseudomonades peut être caractérisée par ce mécanisme suite à l'acquisition de déterminants plasmidiques dont TetA et TetE et qui ont pour fonction d'augmenter l'efflux actif énergie-dépendant de la cellule (**Kaneko et al. 1985 ; Neyfakh. 1992**). D'autres systèmes, tel chez les pseudomonades (**Nikaido. 1994**), sont des protéines d'efflux à large spectre, ou non spécifiques, permettant d'expulser une multitude de drogues.

3-3- "Bypass":

L'acquisition de nouveaux gènes chez une bactérie peut lui permettre de déjouer l'effet toxique d'un antibiotique en contournant l'élément compromis de la voie affectée.

Le "bypass" est fréquemment observé dans la résistance au triméthoprim et aux sulfamidés. Ces agents antimicrobiens ont pour fonction d'interrompre la synthèse d'acide folique en inhibant la dihydrofolate réductase (DHFR) et la dihydroptéroate synthétase (DHPS), respectivement. Toutefois, la présence de DHFR et DHPS d'origine plasmidique, dont dfrAI et sull (**Radstrom et Swedberg. 1988; Sundstrom et al. 1988**), faiblement ou non inhibés par ces composés, assure la synthèse normale d'acide folique chez ces organismes.

3-4- Modification de la cible:

L'acquisition de mutations ponctuelles ou de gènes extrachromosomiques peut induire la modification de la cible d'un antibiotique chez une bactérie, pouvant résulter en une diminution de son affinité pour celle-ci. La résistance à la vancomycine en est un exemple. Cette molécule interfère de façon stérique lors de l'élongation de la chaîne de peptidoglycane de la paroi cellulaire, interagissant ainsi avec le pont polypeptidique D-alanyl-D-alanine.

La production d'une ligase VanA, d'origine plasmidique, modifie la chaîne terminale en incorporant un D-lactate au lieu d'un D-alanine inhibant ainsi son interaction avec la vancomycine (**Arthur et al. 1993**). D'autres exemples, dont une modification des "protéines liant la pénicilline" (PLPs), a aussi été décrite comme ayant une affinité réduite à certaines B-lactamines (**Hakenbeck et al. 1980**).

3-5- Inhibition enzymatique de l'activité d'un antibiotique:

3-5-1- Inactivation enzymatique d'un antibiotique:

L'inactivation enzymatique consiste à détruire la structure fondamentale d'un antibiotique le rendant ainsi inactif. Un exemple frappant de ce type d'inactivation a été identifié dans la résistance aux β -lactamines. Un groupe d'enzymes nommés β -lactamases à la capacité, à l'exception près des β -lactamases de classe B, d'hydrolyser le noyau β -lactame des β -lactamines (**Livermore. 1995**). La destruction de l'anneau β -lactame engendre ainsi une inhibition de l'interaction entre ces composés et leurs cibles, les PLPs.

3-5-2- Modification enzymatique d'un antibiotique:

Ce type d'inactivation enzymatique implique une modification de l'agent antimicrobien inhibant son interaction avec sa cible. Ce mécanisme a particulièrement été démontré chez les membres d'une famille de gènes conférant la résistance aux aminoglycosides. Les aminoglycosides adényltransférases, par exemple, peuvent adényler des aminoglycosides tels la streptomycine et la spectinomycine (**Shaw et al.1995**).

L'addition d'un groupement adényle empêche l'interaction entre ces antibiotiques et la sous-unité 30S du ribosome. Ce mécanisme a aussi été décrit dans la résistance au chloramphénicol pouvant être acétylé par les chloramphénicol acétyltransférases (CATs) (**Shaw. 1984**).

II. Résistance aux B-lactamines:

1- Les B-lactamines:

Les membres de la familles des β -lactamines, caractérisés par la présence d'un anneau β -lactame, se regroupent en différentes classes, selon leur structure fondamentale, et démontrent une forte activité tant chez les bactéries à Gram-négatif qu'à Gram-positif (**Dbaibo. 2000**).

Les pénicillines, dérivées du genre *Penicillium spp*, se caractérisent par un noyau acide, 6-aminopénicillanique, constitué d'un anneau thiazolidine fusionné à un anneau β -lactame.

Les céphalosporines, dérivées du produit de fermentation de *Cephalosporium acremonium*, se composent d'un noyau acide, 7-aminocéphalosporanique, constitué de l'anneau β -lactame fusionné à un anneau dihydrothiazine (**Dbaibo. 2000**).

Cette famille de composés antimicrobiens comprend d'autres membres dont: les aminopénicillines et aminocillines dérivées de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA), les oxacéphèmes, les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame), les carbapénèmes et les monobactames, des β -lactamines à noyau monocyclique (**Araj et Kanj. 2000**).

Les β -lactamines, analogues structuraux de la terminaison peptidyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane, ont pour fonction d'interagir avec un groupe de protéines, les PLPs. L'inhibition de

ces transpeptidases, impliquées dans l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire, par les β -lactamines entraîne une interruption de la synthèse du peptidoglycane et une production subséquente d'enzymes autolytiques entraînant la mort cellulaire (**Stratton. 2000**).

2- Les niveaux de résistance:

Le spectre d'activité des β -lactamases peut être approché par les phénotypes « bas niveau » en l'absence de mutation :

- ↳ Les pénicillines de bas niveau hydrolysent les Pénicillines G, aminopénicillines, carboxypénicillines et uréidopénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique. Ce spectre peut être élargi, notamment en cas de production de pénicillinase de haut niveau, de pénicillinase résistante aux inhibiteurs ou encore de BLSE (β -lactamase à spectre étendu).
- ↳ Les céphalosporinases de bas niveau hydrolysent les céphalosporines de 1ère génération, certaines céphalosporines de 2ème génération ainsi que les pénicillines G et les aminopénicillines. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. On distingue les céphalosporinases inductibles des céphalosporinases déréprimées ou encore de la céfuroximase (*Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*) (**Bauernfeind et al. 1996**).

3- Production de B-lactamases:

3-1- Définition des B-lactamases:

Les β -lactamases ont été identifiées en 1940 comme des enzymes capables de neutraliser les propriétés antibactériennes de la pénicilline (**Abraham et Chain. 1940**).

Mondialement, les bactéries retrouvées en clinique possèdent des variétés de β -lactamases Leur déterminant génétique peut être transféré d'une cellule bactérienne à une autre. Nous retrouvons même des transferts de déterminant génétiques à travers les barrières d'espèces et de genres bactériens (**Datta et Knotomichalou. 1965; Hedges et Jacob. 1974**).

On distingue 2 types de b-lactamases :

- les sérine-B-lactamases, utilisant un site actif à sérine (sérine 78) pour hydrolyser le cycle B-lactame.
- les métallo-B-lactamases, nécessitant des ions Zn^{+2} pour leur activité.

3-2- Mode d'action:

Les β -lactamases catalysent l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes. Pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque.

Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros. 1984).

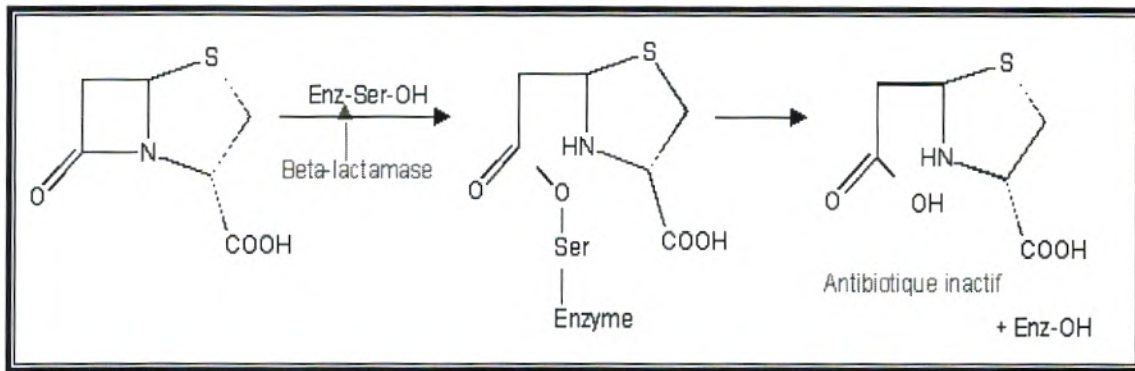


Figure N°1 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β-lactame (Barrial et Scotet. 2006).

La différence majeure entre les β-lactamases et les PLP réside dans la vitesse à laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. En effet, si les PLP ne sont capables d'hydrolyser qu'un cycle β-lactame par heure (l'acylenzyme apparaît dans ce cas comme un intermédiaire stable), les β-lactamases les plus efficaces peuvent en hydrolyser 1000 par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse.

3-3- Classification:

De nombreuses classifications existent, prenant en compte comme critères :

- Les caractéristiques physiques
- Le phénotype : pénicillinases, céphalosporinases...
- La nature du site actif
- La séquence d'acides aminés
- L'origine (plasmidique ou chromosomique)
- La situation constitutive ou inductible

Aujourd'hui, les classifications d'Ambler et de Bush-Jacobi-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes (Bush et al. 1995 ; Jacoby et Bush. 2005).

3-3-1- Classification de Bush:

Cette classification a initialement été décrite par Jack et al en 1970, pour ensuite être révisée à deux reprises par Bush (Bush. 1989 ; Bush et al. 1995). La version récente propose de classer ces enzymes en fonction de: 1) substrat de préférence entre la pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines à large spectre d'activités et imipenem; et 2) profil d'inhibition au clavulanate (Tableau N°2).

Tableau N° 2: Correspondance entre les classifications moléculaire d'Ambler et phénotypique de Bush (Barrial et Scotet, 2006).

Groupes selon Bush-Jacoby-Medeiros	Classes d'Ambler	Enzymes (exemples)	Substrats préférentiels	Inhibées par		Organismes	Localisation
				Ac. clavulanique	EDTA		
1	C	AmpC	Céphalosporines	-	-	Bacilles GRAM négatif	Chromosomique Plasmidique
2a	A	PC1	Pénicillines	+	-	Bactéries GRAM positif	Plasmidique
2b	A	TEM-1, 2 SHV-1	Pénicillines céphalosporines	+	-	Bacilles GRAM négatif Cocci GRAM négatif	Plasmidique Chromosomique
2be	A	TEM-dérivés SHV-dérivés CTX-M-1-26	Pénicillines, céphalosporines à large spectre et à spectre étendu	+	-	Bacilles GRAM négatif <i>P. aeruginosa</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. oxytoca</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>P. aeruginosa</i>	Plasmidique
	D	PER GES-1 OXY-1/2 (K1) OXA- 11,14,16,17		±	-		Chromosomique
2br	A	TEM-30-36, TRC-1, SHV-49	Pénicillines	±	-	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> (résistant aux inhibiteurs)	Plasmidique
2c	A	PSE-1,3 4 BRO-1-3	Pénicillines, carbénicilline	+	-	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>M. catarrhalis</i>	Variable
2d	D	OXA-1-10 PSE-2	Pénicillines cloxacilline	±	-	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Variable
2e	A	CepA FPM-1 L2	Céphalosporines	+	-	<i>Bacteroides sp</i> <i>Proteus sp</i> <i>S. maltophilia</i> (inducible)	Variable
2f	A	NMC-A Sme-1-3 Imi-1-3 KPC-1,2 GES-2	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	+		<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Chromosomique Plasmidique Plasmidique
	D	OXA-24-26,40, 51,58,72		±		<i>A. baumannii</i>	Chromosomique
3	B	VIM, IMP, SPM, GIM L1 CcrA	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	-	+	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. species</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>S. maltophilia</i> <i>Bacteroides sp</i>	Variable

Cette classification phénotypique de β -lactamases pose un certain problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer leur susceptibilité à ces substrats (**Philippon et al. 1989 ; Jacoby et Medeiros. 1991**) et inhibiteurs (**Vedel et al. 1992**).

Un autre aspect restrictif de cette classification relève du fait que l'attribution d'un acronyme à un gène de résistance n'a plus la même signification. Par exemple, les B-lactamases PSE, ou "*Pseudomonas-specific enzymes*", ont aussi été identifiées chez les Enterobacteriaceae, ce qui remet en question la pertinence de ce préfixe (**Matthew et al. 1979**).

3-3-2- Classification d'Ambler:

Initialement proposée par Ambler (**Ambler. 1980**), cette classification repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β -lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de chaque β -lactamase et ne change pas à cause des mutations.

Cette nomenclature se compose de quatre groupes, soit les β -lactamases de classe A, B, C et D (Voir tableau N°2).

3-3-2-1- Les β -lactamases de classe A:

Les β -lactamases de classe A, d'origine chromosomique ou plasmidique, se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de β -lactame. Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70)- induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et de céphalosporoate, analogue aux pénicillinoates, pour les céphalosporines.

Cette sérine est retrouvée dans le site actif de la β -lactamase qui se compose d'hélices α entourées de cinq feuillets β anti-parallèles (**Knox. 1995**) et assure un fort taux de résistance aux pénicillines, céphalosporines et carbénicillines.

Toutefois, les β -lactamases de classe A sont généralement sujettes à l'inhibition par les inhibiteurs de β -lactamases (**Livermore. 1995**). Divers variants des β -lactamases de classe A ont été identifiés et caractérisés chez différents isolats cliniques.

❖ Les β -lactamases de type TEM:

Les β -lactamases de type TEM, d'origine plasmidique, font partie des gènes de résistance les plus disséminés et ce, à travers un grand nombre de groupes d'incompatibilités plasmidiques et d'espèces bactériennes (**Livermore. 1995**). Plus de cinquante combinaisons de mutations ponctuelles ont été identifiées au cours des dernières années.

Ces dernières, en plus d'influencer la structure tridimensionnelle de la protéine de 29 kDa, permettent aux β -lactamases TEM d'élargir leur spectre d'activités, conférant ainsi une résistance accrue aux céphalosporines de troisième génération et inhibiteurs de β -lactamases.

Les changements Gln(37)Lys, Glu(104)Lys et Gly(238)Ser chez le variant TEM-3, par exemple, assure un taux de résistance de 32 µg/ml à la céfotaxime et 64 µg/ml pour la ceftazidime (céphalosporines de troisième génération) par rapport à une résistance de 0.125 µg/ml et de 0.25 µg/ml, respectivement, pour TEM-1 (**Datta et Kontomichalou. 1965 ; Brun-Buisson et al. 1987 ; Sirot et al. 1987**).

Pour sa part, la résistance aux inhibiteurs peut être conférée de trois façons: 1) en remplaçant l'arginine 244 par un acide aminé à chaîne latérale non chargée, comme une cystéine (IRT-1), sérine (IRT-2) ou thréonine (IRT-11); 2) en substituant l'asparagine 276 à l'acide aspartique (IRT-4, -7, -8, -10); et 3) en remplaçant la méthionine 69 avec un acide aminé aliphatique (isoleucine (IRT-3, -8), leucine (IRT-4, -5, -10) ou valine (IRT-6, -7)) (**Nicolas-Chanoine. 1997**). Ces mutations, seules ou en combinaison, créent une résistance aux inhibiteurs sans toutefois modifier le profil d'activités décrit chez TEM-1. D'autres variants de TEM, tel TEM-50, présentant les mutations Met(69)Leu, Glu(104)Lys, Gly(238)Ser et Asn(276)Asp (**Sirot et al. 1997**), confèrent la résistance tant aux inhibiteurs qu'aux céphalosporines de troisième génération.

❖ *Les β-lactamases de type SHV:*

Les β-lactamases de type SHV, en référence à l'inhibition au sulfhydryl, ont longtemps été endémiques au genre *Klebsiella*. Avec un profil de résistance similaire aux β-lactamases de type TEM, cette protéine de 17 kDa est plus active contre la pénicilline mais toutefois plus sensible aux céphalosporines que les enzymes TEM (**Neu. 1982**). Tout comme les β-lactamases TEM, elles peuvent faire varier leur spectre d'activités suite à diverses mutations ponctuelles. Les mutations Gly(238)Ser et Glu(240)Lys chez la β-lactamase SHV-5 (**Billot-Klein et al. 1990**) assurent une résistance de 64 µg/ml à la céfotaxime et de 128 µg/ml à la ceftazidime comparativement à SHV-1 avec des taux de résistance de 0-125 µg/ml et 1 µg/ml respectivement. La résistance à ces molécules et aux inhibiteurs a été observée chez le variant SHV-10 (SHV-5 avec Ser(130)Gly) (**Prinarakis et al. 1997**).

❖ *Les β-lactamases de type PSE:*

La dissémination de ces carbénicillinases de type PSE a longtemps été endémique à une série de plasmides retrouvés chez les pseudomonades. Ces enzymes, PSE-1, PSE-3 et PSE-4, sont aujourd'hui largement disséminées chez les *Enterobacteriaceae spp* et ont une importance particulière dans la résistance à la carbénicilline, ticarcilline, piperacilline et céfoperazone (**Neu. 1986**). Pour sa part, PSE-2 (OXA-10) possède une grande affinité pour l'hydrolyse de l'oxacilline (**Neyfakh. 1992**), ce qui est caractéristique aux β-lactamases de classe D.

Ces enzymes varient principalement par Leur poids moléculaire, leur point isoélectrique et leur profil d'inhibition.

❖ *Autres β-lactamases de classe A:*

Outre les types prédominants de β-lactamases de classe A mentionnées ci-dessus, d'autres membres de cette catégorie ont aussi été identifiés. Par exemple, il est question des β-lactamases BRO, dont BRO-1, -2 et -3, identifiés chez *Moraxella* qui démontrent une résistance aux pénicillines et céphalosporines de première génération (**Christensen et al. 1990 ; Christensen et al. 1991 ; Fung et al. 1994**).

D'autres β-lactamases tel PER-1 de *P. aeruginosa* (**Nordmann et al. 1993**) et Sme-1 de *S.marcescens* (**Yang et al.1990**) ont aussi démontré différents spectres de résistances aux β-lactamines.

3-3-2-2- *Les β-lactamases de classe B:*

Les β-lactamases de classe B sont des métallo-β-lactamases et utilisent un ion de zinc (Zn^{2+}) comme cofacteur permettant ainsi la décomposition de l'anneau β-lactame (**Ambler. 1980; Bando et al. 1991**). Ces enzymes ont été émergés depuis une dizaine d'années, d'abord chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, puis ensuite chez les entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas stutzeri* ou *Pseudomonas putida*. Ces enzymes sont particulièrement présentes en Asie du Sud-Est.

Elles se distinguent par leur habileté à inactiver la majorité des β-lactamines, particulièrement les carbapénèmes, dont l'imipenem, et offrent une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de β-lactamases (**Livermore. 1995**).

3-3-2-3- *Les β-lactamases de classe C:*

Les β-lactamases de classe C, décrites en 1981 par **Jaurin et Grundstrom**, ont longtemps été ubiquitaires aux chromosomes de différentes espèces bactériennes entériques.

Ces céphalosporinases sont généralement produites de façon constitutive et ce, à bas niveau, et ne contribuent que faiblement à la résistance aux β-lactamines.

Toutefois, différentes mutations peuvent engendrer une surexpression conférant un fort taux de résistance. Différentes espèces, dont *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *P. aeruginosa* (**Sanders. 1989**), peuvent exprimer ces céphalosporinases par induction et même, suite à diverses mutations, assurer une forte expression constitutive (**Lindberg et al. 1985**). Plusieurs céphalosporinases, ou AmpC, dont FOX-1 (**Gonzalez Leiza et al. 1994**), CMY-3 (**Jenks et al. 1995**) et MOX-1 (**Horii et al. 1993**), d'origine plasmidique, ont été identifiées chez les

Enterobacteriaceae spp et pourraient être à l'origine des β -lactamases chromosomiques d'*Enterobacter spp* et *Citrobacter freundii* (Livermore. 1995).

3-3-2-4- Les β -lactamases de classe D:

Les β -lactamases de classe D se distinguent par leur capacité à hydrolyser les pénicillines isoxazolyl (oxacilline) et la méthicilline. Ces gènes sont fréquemment observés sur les plasmides de plusieurs espèces entériques. Elles sont retrouvées fréquemment chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (OXA-11, 14, 16, 17 et 19) et peu chez les entérobactéries.

De plus, certains membres de cette famille, dont OXA-10 (PSE-2) et OXA-11 (Hall et al. 1993), possèdent un large spectre d'activités assurant une forte résistance aux céphalosporines de troisième génération dont la céfotaxime, le céfoperazone et la ceftazidime (Hall et al. 1993; Livermore. 1995).

4- Diminution de l'entrée des β -lactamines:

L'équilibre entre l'efflux et l'élimination des β -lactamines, chez les bactéries à Gram-négatif, peut déterminer le niveau de susceptibilité ou de résistance cellulaire.

Toutefois, une diminution unique de l'entrée d'une B-lactamine ne constitue qu'occasionnellement un mécanisme de résistance en soi. Chez ces organismes, les β -lactamines diffusent dans la cellule par l'intermédiaire de protéines membranaires nommées porines (Nikaido. 1979). Différents isolats cliniques d'*E. coli* caractérisés par une altération ou expression réduite de porines de type OmpC et/ou OmpF ont démontré une susceptibilité réduite aux β -lactamines (Harder et al. 1981; Jaffe et al 1982 ; Livemore. 1988). L'émergence récente d'isolats de *P. aeruginosa* résistants à l'imipenem, a aussi été démontrée par l'altération ou même l'absence de la porine OprD (Trias et al. 1989) diminuant leur susceptibilité à cet antibiotique.

5- Altération des PLPs ou modification de la cible:

La résistance aux β -lactamines, conférée par les PLPs, chez les bactéries à Gram négatif joue un rôle mineur dans la résistance comparativement aux bactéries à Gram positif (Spratt et al. 1989). Différents cas dont l'altération des PLP1 et 2 chez *Neisseria gonorrhoeae* (Faruki et Sparling. 1986) ont été décrits.

Cette résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β -lactamines (Georgopapadakou. 1993).

Les PLPs sont responsables de la polymérisation des molécules précurseurs disaccharide-pentapeptides impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire peptidoglycane. Les *B*-lactamines se lient sur les PLPs et empêchent la synthèse de la paroi cellulaire éliminant la bactérie par un effet bactéricide selon une analogie structurale au Dalanyl-D-alanine (**Ghuysen. 1994**).

III. Les Entérobactéries productrices de BLSE:

1- L'historique:

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983 en Allemagne (**Knoth et al. 1983 ; Kliebe et al. 1985**) chez *K. ozaenae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. marcescens*. Cette BLSE a été appelée SHV-2. D'autres BLSE avec un profil de substrat comparable avaient préalablement été observée dès 1982 chez *K. oxytoca*, mais elles étaient d'origine chromosomique alors que les BLSE envisagée dans ce travail sont (actuellement) plasmidiques.

En Afrique, des *K. pneumoniae* mais aussi *E. coli* et *S. typhimurium* productrices de SHV-2 ont été observées dès 1984 (**Spencer et al. 1987**). Les premières observations venaient de Tunisie, mais d'autres pays sont certainement impliqués. Les enzymes impliqués et les caractères associés de résistance sont très variables. Ainsi aux Etats-Unis, la première description date d'août 1988 à l'occasion d'une épidémie dans un établissement de long séjour du Massachusetts, deux enzymes (YOU-1, YOU-2) ont été isolées (**Venezia et al. 1995 ; Quale et al. 2002 ; Gruteke et al. 2003 ; Paterson et al. 2003 ; Miranda et al. 2004**).

Toujours en 1988, TEM-10 est décrit, puis en juin 1989, c'est TEM-26 qui est identifiée et responsable d'une épidémie dans un service d'oncologie pédiatrique (**Naumovski et al. 1992**).

Cette nouvelle résistance y a été reconnue en novembre 1989, mais l'étude a posteriori des isolats de *K. pneumoniae* a permis de retrouver leur présence chez 155 patients depuis octobre 1988. Les enzymes étaient ici TEM-10 ou TEM-26 (**Liu et al. 1992 ; Meyer et al. 1993 ; Urban et al. 1994**).

Il y a actuellement plus de 200 BLSE caractérisées (**Barral et Scotet. 2006**), dont 5 dérivent de SHV-1 et les autres de TEM-1 et TEM-2 (**Philippon et al. 1989 ; Jacoby et Medeiros. 1991 ; Sanders et Sanders. 1992 ; Bush et al. 1995**).

La terminologie se réfère soit au phénotype de résistance (type céfotaximase telles CTX-1 (TEM-3), SHV-2 ou SHV-3, ou type ceftazidimase telles CAZ-5 (SHV-4), CAZ-4 (SHV-5) ou CAZ-6 (TEM-24) soit à l'origine des enzymes dérivées de TEM ou de SHV (**Bush et al. 1995**).

2- B-lactamases à spectre étendue: BLSE:

2-1- Caractéristiques générales sur les BLSE:

Par définition, les BLSE (enzymes de classe A) sont inhibées, *in vitro*, par l'acide clavulanique. Il y a donc une activité intermédiaire pour l'association de β -lactamines avec des inhibiteurs de β -lactamases (**Bush et Singer. 1989 ; Jacoby et Medeiros. 1991**)

Elles hydrolysent la majorité des β -lactamines y compris les C3G et les céphalosporines à large spectre (céfépime et cefpirome). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (**Paterson et Bonomo. 2005**).

Aujourd'hui, plus de 200 BLSE naturelles ont été classées dans 11 familles différentes selon leur séquence d'acides aminés : les types TEM, SHV, CTXM, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. Les BLSE les plus importantes dérivent des TEM-1,2 et SHV-1 (**Barrial et Scotet. 2006**).

2-2- Caractéristiques moléculaires des BLSE:

Leur apparition s'explique par la mutation des gènes des plasmides de TEM et SHV (**Bush et al. 1995**). En effet, une seule mutation sur le plasmide de TEM ou SHV peut provoquer une modification du site actif de l'enzyme et donc une modulation de l'activité pouvant s'exprimer de façon variable vis-à-vis des C3G (Figure N°2) (**Paterson et Bonomo. 2005**).

Cette substitution en acide aminé ne concerne qu'un nombre restreint de position mais certaines sont particulièrement importantes. Il a été montré que, pour TEM, les acides aminés les plus mutés sont en position 104, 164, 238 et 240 (**Perilli et al. 1997**). Les acides substitués sont la lysine, la sérine, la leucine et l'histidine (**Philippon et Arlet.2005**).

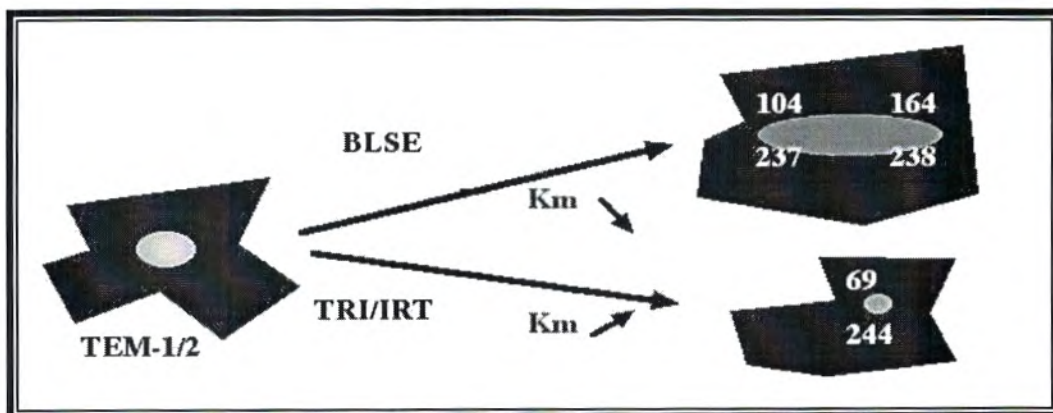


Figure N°2 : Schéma de l'évolution des TEM-1/2 (Minasov et al. 2002).

Cela a une importance car la mutation du gène entraînant une variation de la structure protéique de l'enzyme synthétisé, l'affinité de l'enzyme pour la β -lactamine peut en être modifiée. Les mutations ne concernent jamais la sérine 70 du site actif (Paterson et Bonomo. 2005).

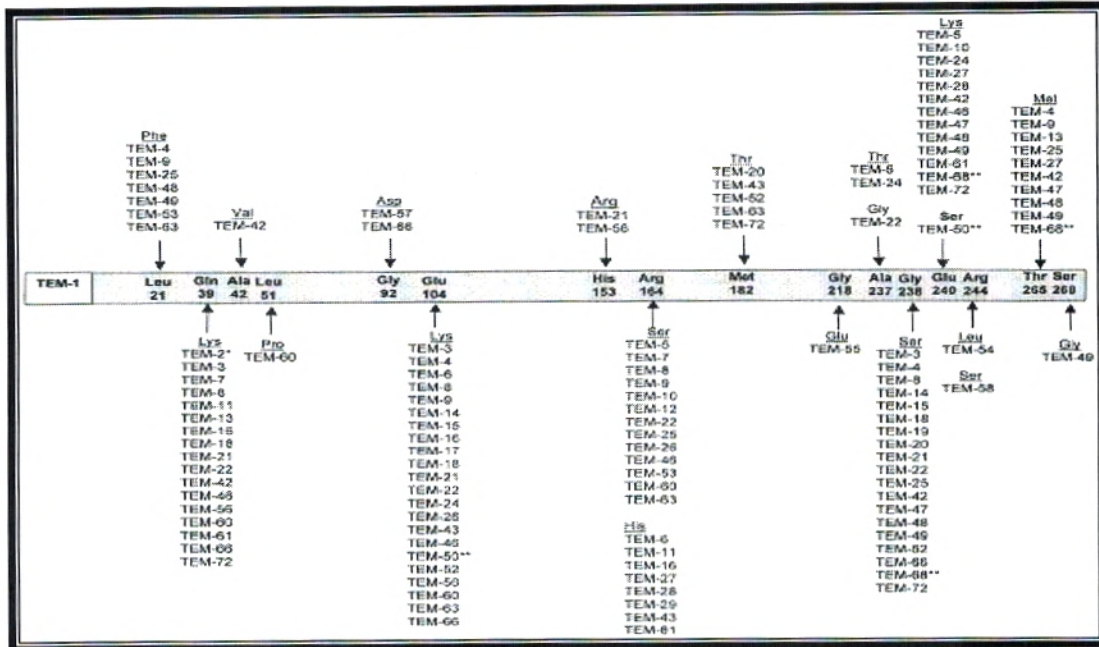


Figure N°3 : Les BLSE dérivées de TEM (Sutcliffe. 1978 ; Ambler et al. 1991).

Parfois, la mutation de l'acide aminé sur TEM peut entraîner une baisse de l'affinité de la β -lactamase pour l'ensemble des β -lactamines et en particulier pour les inhibiteurs (Figure N°3). Ces enzymes de classe A sont appelés TRI pour TEM résistant aux inhibiteurs. Ils ont une faible activité en entraînant qu'une faible augmentation des CMI (Philippon et Arlet.2005).

Il a été montré une homologie à 98% entre les CTX-M du groupe 1 (notamment CTX-M-2) et la β -lactamase chromosomique de *Kluyvera ascorbata* (gène *klu*), bactérie de l'environnement, alors qu'il n'existe que 40% d'homologie avec les TEM et SHV (**Bonnet et al. 2000**).

2-3-2- Classification:

Les premières CTX-M sont classées, selon leur séquence en acides aminés, en quatre groupes (**Philippon et Arlet. 2005**):

- Groupe 1 : CTX-M-2, 4, 5, 6, 7 et 20
- Groupe 2 : CTX-M-1, 3, 10, 11, 12 et 15
- Groupe 3 : CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 19 et 21
- Groupe 4 : CTX-M-8

Ces β -lactamases possèdent une capacité de diffusion et d'évolution importante. En effet, certaines continuent même de s'élargir pour devenir actifs sur la ceftazidime, comme les CTX-M-15 et 16 (**Bonnet et al. 2000**).

D'autre part, les enzymes ayant un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam sont décrits chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ce sont les type PER pour *Pseudomonas extended* résistance et GES chez *Klebsiella pneumoniae* surtout. Ils dérivent des TEM et SHV par mutation et ont été décrits en France. Il est possible de les retrouver aussi chez *Acinetobacter baumannii* (**Barrial et Scotet. 2006**).

3- Epidémiologie clinique des Entérobactéries productrices de BLSE :

La circulation des souches de *K. pneumoniae* dans un hôpital et dans les hôpitaux est connue. En 1969, *K. pneumoniae* a acquis un plasmide de résistance à la gentamicine (**Pena et al. 1997**), ainsi qu'à d'autres antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline...) (**Prodinge et al. 1996 ; Pitout et al. 1998 ; Mulvey et al. 2004**).

Ce plasmide et ces souches ont rapidement diffusé au cours des années 70 et de nombreuses épidémies ont été décrites, dont les caractéristiques devraient s'appliquer aux souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE (KBLSE) (**Quinn. 1994**). Il convient maintenant d'aborder la question des différents facteurs ayant participé à l'émergence des BLSE, et leur dissémination.

3-1- Réservoirs :

L'intestin des patients hospitalisés est le réservoir essentiel des EBLSE (**Lucet et al. 1996 ; Pena et al. 1998**). Occasionnellement d'autres réservoirs peuvent être la source d'épidémies, comme des urines infectées les bouches ou poches d'urines, ou un mélange nutritif (**Decré et al. 2000**). Généralement, à partir du réservoir intestinal, d'autres réservoirs secondaires peuvent exister (plaie, drains, trachée, oro-pharynx). La peau peut aussi être colonisée mais bien moins souvent que le

tube digestif (**Casewell et Phillips. 1977**). L'environnement joue un rôle négligeable, même si l'on peut retrouver la souche de *K. pneumoniae* sur le sol ou certaines surfaces de chambres des patients colonisés (**Kim et al. 2002**).

Le délai moyen de colonisation après l'admission varie de 10 jours à 3 semaines (**Brun Buisson et al. 1987 ; Lucet et al. 1996**).

3-2- Modes de transmission:

La transmission est manuportée (**Casewell et Phillips. 1977**), même si les *Klebsiella* ne persistent pas longtemps sur les mains (**Shlaes et al. 1997**). Elles sont par contre contaminées avec la ou les souches du malade juste après les soins (**Decré et al. 1998**).

Les BLSE sont transmis soit directement de patient à patient, soit par l'intermédiaire du personnel soignant (**Philippon et al. 1989 ; Jacoby et Medeiros. 1991**).

En fin la circulation à l'intérieur des hôpitaux, le plus souvent à partir des services de réanimation est également constatée (**Proding et al. 1996**).

3-3- Facteurs de risque:

Les facteurs retrouvés sont analogues qu'il s'agisse de colonisation digestive ou d'infection nosocomiale. La durée de séjour, la prescription préalable d'antibiotique, la réalisation de diverses procédures invasives sont habituellement retrouvées (**Dechamps et al. 1991 ; Arlet et al. 1995 ; Lucet et al. 1996**), ainsi que la proximité géographique avec des patients colonisés. Ces facteurs prédisposants ont été très souvent retrouvés pour de nombreuses infections nosocomiales (**Schiappa et al. 1996 ; Lautenbach et al. 2001**).

Les deux paramètres essentiels chez un patient exposé au risque de colonisation sont la densité des soins (c'est-à-dire la fréquence des contacts patient/personnel) et la durée du séjour (**Lin et al. 2003**). En d'autres termes, les antibiotiques exercent une pression de sélection non-négligeable (**Dworzack et al. 1987 ; Jacobson et al. 1995 ; Toltzis et Blumer. 1995 ; Rice et al. 1996**), et cette pression de sélection est d'autant plus marquée que le nombre de patients traités est important et que la durée de l'antibiothérapie est longue (**Follath et al. 1987**).

De plus, on peut constater que l'évaluation de la restriction de l'utilisation des antibiotiques est encore plus difficile. Comme cela a été suggéré pour la résistance à la gentamicine, la forte utilisation de céfotaxime (**Brun Buisson et al. 1987**), ou surtout de ceftazidime (**Naumovski et al. 1992 ; Meyer et al. 1993**), ou l'amikacine avec ou sans réduction de la gentamicine ont été incriminés. Les effets de la restriction, ou de l'arrêt de la prescription qui a permis la diminution du nombre de BLSE (**Chow et al. 1991 ; Meyer et al. 1993**), sont discordants selon les études (**Rice et al. 1990 ; Lucet et al. 1996**).

IV. Les Huiles Essentielles:

1- Définition:

D'après **Macquer 1766**: «On nomme huiles essentielles toutes celles qui ont dans un degré marquée l'odeur du végétal dont elles sont tirées ; il n'y a aucune de ces huiles qui n'ait assez de volatilité pour s'élever au degré de chaleur de l'eau bouillante ; d'où il suit que ce degré de volatilité, est encore un des caractères spécifiques de ces sortes d'huiles ; elles diffèrent de toutes les autres, par ce degré de volatilité qui leur est propre (...)»

Donc, l'huile essentielle représente l'ensemble des substances volatiles de faible masse moléculaire extraits du végétal, soit par entraînement à la vapeur (avec ou sans présence d'eau), soit par expression (pressage des zestes de fruits frais, citrals et hespéridés) (**Richard. 1989**).

Comparer ce texte avec celui de **Chevreul. 1819**: «Les huiles végétales volatiles ont pour caractère d'avoir toutes une odeur plus ou moins forte; d'avoir une saveur plus ou moins âcre; d'être un peu solubles dans l'eau; de passer à la distillation avec ce liquide, et de lui communiquer leur odeur ; de se volatiliser, sans décomposition, à une température de 150 à 160 degrés.

2- La répartition et localisation des huiles essentielles:

Les huiles essentielles n'existe quasiment que chez les végétaux supérieures: il y aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatiques.

Les huiles essentielles peuvent être extraites de différentes parties de la plante : fleurs, écorces de fruits, graines, feuilles, baies, boutons floraux, fruits, bois.

En principe, toutes les parties d'une plante contiennent ces huiles essentielles, mais elles sont souvent majoritairement dans l'une d'elles (**Richard. 1989**). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peuvent varier selon sa localisation (**Bruneton. 1999**).

La composition peut varier selon la localisation dans la plante, par exemple, dans l'oranger amer, le zeste donne l'essence de Curaçao, et la fleur, l'essence de Néroli. La teneur des plantes en huile essentielle est faible de l'ordre de 1 à 3 % à l'exception du clou de girofle de (14 à 19 %), du macis (10 à 13 %), de la noix de muscade (8 à 9 %), de la cardamome (4 à 10%).

Le stockage et la synthèse des huiles essentielles peuvent s'effectuer dans des cavités, alvéoles ou poches (cas des hespéridés) ou canaux sécréteurs (cas des pinus, des commiphora). Mais il arrive que ces sites consistent en formation très superficielle (poils ou trichomes glandulaires) (**Garnéro. 1991**).

3- La fonction des huiles essentielles:

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré. En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchet du métabolisme (**Belaïche. 1979**).

Ainsi, la fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure (**Bruneton. 1999**).

Les fonctions possibles des huiles essentielles sont multiples (protection contre les prédateurs de la plante, attraction des insectes pollinisateurs, inhibition de la germination et de la croissance, inhibition de la multiplication des bactéries et des champignons). Il est souvent difficile de les préciser pour chaque cas particulier (**Richter. 1993**).

4- Composition chimique:

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, contenant de très nombreuses espèces chimiques (de l'ordre d'une centaine à plusieurs centaines), identifiables par chromatographie. Il s'agit d'espèces organiques: des terpénoïdes et des aromatiques (aldéhydes, esters, alcools...). L'espèce majoritaire est appelée principe actif (**Biondi et al. 1993**).

Elle peuvent également renferme divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatiles, ces composés contribuent souvent aux arômes des fruits.

Ces constituants jouent du point de vue parfum des rôles d'inégalité importance: les uns contribuent puissamment à l'arôme de l'essence, certains participent simplement à l'harmonie de mélange; d'autres sont complètement inodores ou peut odorants, ceux-ci ont un rôle tout a fait effacé (**Bruneton. 1999**).

5- Les techniques d'obtention des huiles essentielles:

Par définition, les huiles essentielles sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau. Mais autour de cette technique de base, il existe actuellement plusieurs procédés technologiques ou plusieurs façons de faire différentes.

5-1- Distillation à l'eau ou "hydrodistillation":

Le matériel végétal à distiller se trouve en contact direct avec l'eau bouillante. Il peut flotter ou être complètement immergé selon sa densité et la quantité de matière manipulée. L'évaporation de l'eau dans l'alambic peut être réalisée par chauffage direct (alambic à feu nu) ou par injection de vapeur surchauffée.

Cette méthode est conseillée pour les matières premières qui, par nature, s'agglutinent facilement et donc empêchent la pénétration de la vapeur dans la masse végétale, telles que les pétales de roses, les fleurs d'orangers, etc. (**Ames et Mathiew. 1968**). Elle est encore à conseiller dans les

cas où des produits indésirables ont une importante solubilité dans l'eau. Ils sont alors retenus et n'apparaissent pas dans l'huile recueillie (**Muñoz. 1987**).

5-2- Distillation à la vapeur d'eau dans un alambic à double fond : "Vapo-hydrodistillation":

Le matériel végétal, dans ce cas, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic. La partie inférieure de celui-ci est remplie d'eau.

Le niveau de cette dernière doit permettre d'éviter tout contact entre l'eau et la plante. Comme dans le cas précédent, l'évaporation de l'eau peut être obtenue par chauffage direct (alambic à feu nu) ou par injection de vapeur surchauffée dans la chemise formant le fond de l'alambic. À l'intérieur de l'alambic, il y a production d'une vapeur d'eau saturée (mouillée) à pression faible qui traverse la masse du végétal du bas en haut (**Taoussi. 1992**).

5-3- Distillation à la vapeur directe : "générateur séparé" ou "vapodistillation":

Cette méthode ressemble à celle décrite précédemment, sauf que cette fois il n'y a pas d'eau au fond de l'alambic. La vapeur saturée ou surchauffée à pression généralement supérieure à la pression atmosphérique est introduite au fond de l'alambic par un système de conduite et traverse la masse végétale de bas en haut. La vapeur provient d'une chaudière indépendante. C'est la forme de distillation la plus avancée techniquement. L'alimentation de l'alambic avec de la vapeur surchauffée permet une réduction du coût de l'opération (consommation plus faible d'énergie) (**Guenther. 1965**).

5-4- L'expression à froid:

La technique de l'expression à froid est réservée aux agrumes. L'huile essentielle des agrumes est contenue dans de petites poches situées sur la peau du fruit. Pour en obtenir la plus grande quantité, on gratte le zeste puis on utilise des presses hydrauliques. La pulpe et l'huile essentielle sont ensuite séparées à la centrifugeuse.

Ces essences sont des produits très fragiles en raison de leurs compositions terpéniques et aldéhydiques (**Garnéro. 1991**).

5-5- Autres techniques:

5-5-1- L'extraction par solvant:

Le matériel végétal, les fleurs par exemple, est chargé dans un extracteur spécialement construit contenant un solvant hautement purifié. Le solvant circulant à travers le matériel végétal en extrait les constituants d'arôme ainsi que d'autres substances liposolubles. Le solvant est éliminé par évaporation et on obtient une concrète ou résinoïde. Les caractéristiques physico-chimiques de la concrète obtenue dépendent surtout du solvant utilisé (**Muñoz. 1987**).

L'extraction conduit certainement à des produits représentant mieux le parfum naturel existant dans le matériel végétal mais cette technique ne peut remplacer entièrement la distillation, surtout par entraînement à la vapeur directe car celle-ci a l'avantage d'être moins coûteuse, plus simple et ne demande pas de main d'œuvre très spécialisée.

5-5-2- L'extraction par le dioxyde de carbone (CO₂):

Les études publiées par **Ondarza et Sanchez. 1990** et **Pellerin. 1991** mettent le CO₂ supercritique au sommet de l'échelle des solvants utilisables actuellement pour l'extraction des arômes.

Le dioxyde de carbone refroidi et comprimé à une pression inférieure à la pression critique passe à l'état liquide. Il est ensuite comprimé puis chauffé à une pression et température choisies en fonction du type d'extrait que l'on veut réaliser " huile essentielle " ou "oléorésine".

Le fluide traverse alors la cuve d'extraction où il dissout l'extrait contenu dans le matériel végétal. Le CO₂ supercritique chargé en soluté est ensuite détendu au-dessous de la pression critique, perdant ainsi ses propriétés de solvant. Le fluide entre ensuite dans le séparateur, où le CO₂ passe à l'état gazeux, permettant ainsi aux solutés de précipiter (condenser) et d'être récupérés (**Richard. 1985**).

5-5-3- L'extraction assistée par micro-ondes:

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique encore plus récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques.

Le rayonnement micro-onde permet de chauffer sélectivement l'eau présente naturellement dans le matériel végétal. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères (cas de la menthe par exemple), crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Cette huile peut être recueillie dans un solvant ou entraînée avec la vapeur d'eau contenue dans le végétal, vers un système de récupération. Ce dernier fonctionne, généralement, sous vide (**Jean et al. 1992**).

6- Domaines d'utilisation :

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire (**Baudoux. 2000**).

Différentes études récentes ont confirmé, in vitro, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles (**Hammer et al. 1999 ; Cassella et al. 2002**).

6-1- En pharmacie:

Les plantes médicinales sont utilisées en nature, en particulier pour la préparation d'infusions et sous la forme de préparation galénique simple. Elles sont également utilisées pour obtention des huiles essentielles dont certaines peuvent avoir un intérêt médicamenteux (**Singh et al. 1983**).

Certaines plantes contiennent dans leurs organes (feuilles, fruits, fleurs...) des substances à propriétés thérapeutiques et antiparasitaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes...) (**Lhoste et al. 1993; Pamo et al. 2003**). De plus, l'absence de résistance des germes aux essences végétales, donne à celles-ci une place parmi les moyens thérapeutiques de désinfection (**Belaïche. 1979**).

Les huiles essentielles d'un nombre d'entre elles sont dotées de toute une gamme de propriétés biologiques (insecticide, bactéricide, fongicide, acaricide ...) et ont déjà fait l'objet d'études phytochimiques et biologiques (**Pamo et al. 2002 ; Ling et al. 2003 ; Pamo et al. 2003**).

De même, la composition chimique et l'efficacité antibactéricide de l'huile essentielle des feuilles d'*Eucalyptus saligna* Smith (**Iwu et Chiori. 1984, Bamba et al. 1993, Chowdhury. 2002 ; Ling et al 2003**), qui est un arbre très répandu au monde et ayant de multiples usages (**Cimanga et al. 2002**).

6-2- En parfumerie:

La majorité des produits cosmétique, contiennent une certaine quantité d'huile essentielle comme élément de parfum, il serait probable que ces essences servent aussi à préserver ces cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable (**Beylier-Maurel. 1976**).

L'activité des huiles essentielles de parfumerie, en combinaison avec d'autres antimicrobiens, représente un intéressant terrain d'investigation dans ce domaine de la conservation des cosmétiques.

6-3- Dans les industries agroalimentaires:

L'activité antimicrobienne, des extraits des plantes utilisée dans l'assaisonnement des aliments, a été reconnue depuis longtemps.

Les essences végétales paraissent donc tout indiquées pour jouer un rôle de conservateur naturel dans l'industrie alimentaire, et suppléer aux produits chimique; plus ou moins bien acceptés par le consommateur.

Le thym peut être utilisé dans diverses préparations alimentaire comme le "Smen" par exemple (**Ismaili-Allaoui. 1983; Banquour. 1984**).

Les aromates et les huiles essentielles qui ont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût et qui ont aussi un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer. En effet, tous les segments alimentaires sont consommateurs: alcools, boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, produits de boulangerie, sans oublier la nutrition animale (**Bruneton. 1999**).

7- La Phytothérapie:

7-1- Définition:

La phytothérapie est née avec l'homme. L'Amérique précolombienne possédait déjà une exceptionnelle richesse de plantes qui lui permettait de pratiquer des thérapies magiques ou semi rationnelles. Les papyrus d'Ebens nous apprennent qu'en 2000 avant Jésus Christ les Egyptiens savaient anesthésier grâce à certains végétaux, c'est-à-dire grâce à la phytothérapie. Les Babyloniens et les Phéniciens également étaient très familiarisés avec la phytothérapie. Ils imposaient des règles strictes d'hygiène et de traitement par les plantes dans les cas de maladies cutanées, vénériennes, contagieuses, digestives, cardiaques...

"Thérapie curative utilisant une pharmacopée tirée du monde végétal", voici comment Pierre Manoury définit la Phytothérapie. La Phytothérapie est une thérapie douce qui se suffit à elle-même (**Ausloos. 2002.**)

C'est le traitement des maladies par les plantes, transformée depuis le XIX^{ème} siècle par l'emploi des extraits de plantes, puis par celui des substances actives isolées de celles-ci.

La phytothérapie contemporaine est devenue véritable science.

7-2- Utilité de Phytothérapie:

La Phytothérapie s'utilise sous forme de tisanes, d'infusions, de décoctions, de macérations, de gélules ou d'aromathérapie. Il se distingue alors 5 grandes catégories distinctes dans la Phytothérapie :

- les mélanges de plantes en l'état pour les tisanes et infusions,
- les gélules de plantes micronisées,
- les minéraux,
- les vitamines,
- les essences de plantes, ou Huiles Essentielles.

La Phytothérapie est donc considérée comme une véritable médecine par les plantes. Bien sûr, chaque personne est différente et chacun réagit alors différemment à la Phytothérapie. De plus, l'effet des plantes n'est pas instantané, c'est pourquoi il faut attendre deux semaines minimum pour se rendre compte des bienfaits de la phytothérapie (**Salamone et al. 2001**).

Fort de ce constat, le recours à la phytothérapie par l'utilisation des huiles essentielles des plantes naturelles semble une solution moins coûteuse avec peu, sinon pas d'impact sur l'environnement (Wharton. 1976 ; Pamo et al. 2004).

8- L'aromathérapie:

8-1- Définition:

Depuis des millénaires et un peu partout dans le monde, l'homme utilise les plantes pour se soigner, que ce soit les guérisseurs, les sorciers ou les thérapeutes. Les aromates sont reconnus depuis l'antiquité (Borsotto et Assone. 2001).

L'aromathérapie vient du mot grec "arma" qui signifie épices. Il s'agit d'une méthode de soin naturelle. Elle ne fait appelle qu'aux Huiles Essentielles, substances issues de plantes aromatiques. L'aromathérapie fait partie de la phytothérapie, c'est-à-dire la thérapie par les plantes (Salamone et al. 2001).

C'est une méthode préventive et curative par voie interne et externe utilisant les nombreuses propriétés des huiles essentielles (antiseptiques, bactéricides, antifongique,...).

L'aromatogramme est la méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles équivalente de l'antibiogramme, sauf qu'elle utilise, au lieu des antibiotiques les huiles essentielles (Valnet. 1984).

8-2- Utilité de l'aromathérapie:

L'aromathérapie exerce un effet harmonisateur sur le plan physique, psychique et mental. On utilise l'aromathérapie pour renforcer et stimuler les systèmes de défense naturels de l'organisme. Il s'agit d'une méthode naturelle remarquable pour lutter contre le stress et ainsi induire à un état de relaxation et de détente afin de trouver une sensation de bien-être. En effet, l'aromathérapie agit directement sur le système nerveux central qui permet de rétablir l'équilibre perturbé.

Un dosage d'huiles essentielles pures et naturelles ayant un effet anti-stress, amincissant et anti-cellulite (Salamone et al. 2001).

9- Toxicité des huiles essentielles:

Il faut distinguer l'activité de l'huile essentielle et celle de la plante infusée. Il existe souvent un seuil, au-delà duquel, elles peuvent devenir toxiques. L'utilisation des plantes et des huiles est contrôlée par le code de la santé publique.

Certaines espèces peuvent être employées sans crainte pour soigner des affections banales; nous devons, néanmoins, attirer l'attention des utilisateurs des remèdes naturels, sur les dangers ou les emplois abusifs, souvent méconnus, de plusieurs plantes toxiques (Benmerabet et Abed. 1982).

Mis à part les plantes toxiques, les plantes à effet bénéfique peuvent avoir des réactions secondaires suite à une utilisation abusive à des doses exagérées et de manière non contrôlée, car l'huile essentielle elle-même; peut contenir des substances toxiques qui sont sans effet à des doses minimales, et actives à des doses supérieures (Valnet. 1984).

V. Les plantes utilisées dans cette étude:

1- *Thymus capitatus*:

1-1- Description botanique:

Thymus capitatus (Thym, "Zaatar") est une plante spontanée appartenant à la famille des Labiées, raide, dressée, à rameaux étalés. C'est un sous-arbrisseau de 20 à 40 cm de hauteur à feuilles petites linéaires ou linéaires-lancéolées, aiguës, ponctuées-glandulaires. Les fleurs sont roses et visibles de mai à octobre, à odeur très agréable et spécifique (Le Floc'k. 1983).



*Photo N°1: Thym: Thymus capitatus
en latin, Za'tar en Arabe (Ausloos. 2002.)*

Selon **Borsotto et Assone. 2001**. Petites feuilles persistantes, aromatiques, gris vert, linéaires. Rameaux bien visibles, blanc argenté. Plante très ligneuse, port en boule ramifiée rigide. Plante caractéristique des paysages montagneux de Crète. Abondante floraison rose pourpre en inflorescences coniques à l'extrémité des tiges, en juillet (**Biondi et al. 1993**). Avec plus de 300 espèces, tous les thyms ont besoin d'un sol bien drainé, pauvre et caillouteux (**Salamone et al. 2001**).

1-2- Classification:

Le *Thymus capitatus* est classé selon **Quezel et Santa. 1963** comme suit:

Embranchement	Phanérogames
Sous- Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédons
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Capitatus L.</i>

1-3- Propriétés:

Le thym est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques (**Le Flo'k. 1983**). Les feuilles de thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés mises à profit en phytothérapie. Elle est très antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée.

Plusieurs études ont montré que le carvacrol présente plusieurs activités biologiques (**Duke. 1998**): il est antibactérien, antidiurétique, anti-inflammatoire, antioxydant, antiseptique, anthelminthique, antispasmodique, antitussif, expectorant, carminative, fongicide, irritant, pesticide et vermifuge.

2- *Ammoïdes verticillata*:

2-1- Description botanique:

Ammoïdes verticillata est une plante odorante qui pousse spontanément dans le Nord d'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Pakistan).

C'est une plante annuelle de 15-35 cm, glaucescent à racines grêles pivotantes, tige dressée, striée, à nombreux rameaux étalés. Porte des feuilles adulte, stériles, pennatiséquées à 3-4 segments, très rapprochées et étroites. Les ombelles sont petites à 6-12 rayons, capillaires très inégaux.

Les fruits sont environ de 1 mm de long, avec des ovoïdes très légers comprimés par le dos, recouverts par des poils épais (**Guinochet et Vilmorin. 1975**).

Donc, c'est une espèce végétale spontanée, annuelle, à souche filiforme, à tiges très ramifiées de 10-40 cm, sans rosette de feuilles basales. Existe généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes et les forêts (**Quezel et Santa. 1963**).

2-2- Classification:

D'après **Quezel et Santa. 1963**, *Ammoïdes verticillata* est classée suivant la clé de détermination botanique comme suit:

Embranchement	Phanérogames
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédons
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Tubiflorales
Famille	Ombellifères
Genre	<i>Ammoïdes (Ptychotis)</i>
Espèce	<i>Verticillata</i>

1-3- Propriétés:

Les plantes appartenant à la famille des ombellifères ont une vaste utilisation dans les différents domaines (condiments alimentaires, médecine traditionnelle...) à cause de leurs propriétés thérapeutiques, reconnues par les anciens.

L'activité antimicrobienne des extraits de cette plante, en particulier huiles essentielles, ont été largement étudiées à ces dernières années (**Biondi et al. 1993 ; Remmal et al. 1993 ; Laouer et al. 1998**)

En Inde, elle a toujours été utilisée comme source de thymol, ce dernier est très utilisé en médecine contre la toux, l'irritation de la gorge et dans des cas de choléra (**Brunke. 1985**).

L'infusion de NOUKHA (c'est la plante *Ammoïdes verticillata*) est utilisée comme antipyrétique, analgésique, anti-infectieux, antispasmodique (surtout conseillée dans les spasmes gastro-infectieux), et rafraîchissante.

*Matériels
Et
Méthodes*

1. Patients et prélèvements:

1- Le choix de service de la réanimation:

La réanimation, "épicerie de la résistance aux antibiotiques", est et restera la discipline médicale où les infections nosocomiales sont les plus fréquentes.

Cette situation est évidemment due à la conjonction de la fréquence d'utilisation des dispositifs invasifs, de la réduction des défenses associée à l'immunodépression relative secondaire à la pathologie aiguë et de la fréquence croissante – avec le vieillissement de la population – des pathologies chroniques associées (**Annane et al. 2003.**).

Le choix du service de réanimation du CHU Tlemcen a pour but de faire le point sur la situation épidémiologique et surtout la diffusion des bactéries multirésistantes et leur état de résistance des germes isolés dans ce service.

2- Patients:

C'est une étude rétrospective menée sur 123 prélèvements qui ont été analysés entre 15 Décembre et 15 Avril 2006, à partir de patients hospitalisés dans le service de réanimation du C.H.U Tlemcen.

Tous les patients hospitalisés plus de 48 heures ont été inclus dans l'étude. Les doublons (même bactérie chez le même patient pendant toute la durée de l'étude) ont été éliminés.

Les EBLSE étaient considérées comme importées lorsqu'elles étaient isolées au cours des deux premiers jours d'hospitalisation, dans les autres cas, les EBLSE étaient considérées comme acquises (après 48 heures d'hospitalisation).

3- Prélèvements:

Deux types de prélèvements ont été effectués :

❖ ***Prélèvement rectal:***

La recherche de la colonisation digestive a été réalisée à partir d'un écouvillonnage rectal prélevé moins de 48 heures après l'admission de chaque patient, puis de façon systématique toutes les semaines jusqu'à la sortie.

Cette technique d'écouvillonnage consiste à faire poser un écouvillon stérile humidifié avec l'eau distillée stérile à l'intérieure du côlon.

❖ ***Prélèvement à partir des sondes d'intubation:***

La même méthode est utilisée pour les prélèvements sur sondes d'intubation chez les patients ventilés artificiellement à l'intermédiaire d'un tube endotrachéal. On fait passer un écouvillon stérile humidifié sur toute la surface du tube endotrachéal chez un patient intubé au moins 1 heure à l'avant.

4- Ensemencement :

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée:

- ↳ Une gélose de Mac-Conkey : pour l'isolement de bactéries gram. (-) grâce à l'action de deux inhibiteurs, cristal violet pour l'inhibition de la flore gram (+), et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries et *Pseudomonas*.
- ↳ Une gélose de cetrimide : pour l'isolement des espèces de *Pseudomonas* et apparentés.

Tous ces milieux ensemencés, ont été incubés à $37\text{ C}^\circ \pm 1\text{ C}^\circ$ pendant 24 heures à 48 heures.

5- Isolement et purification :

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont re-isolées sur les mêmes milieux afin d'obtenir des souches pures.

II. L'identification des germes isolés:

1- Galerie API 20E:

➤ Principe:

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (Analytical profil index).

API 20E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E (Biomérieux) sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présentent sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester.

➤ Technique:

On réunie fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.

Enfin, on incube à $37\text{ C}^\circ \pm 1\text{ C}^\circ$ pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture:**

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation.

2- Galerie API 20NE:

➤ **Principe:**

API 20NE est un système standardisés pour l'identification des bacilles à Gram négatif non Entérobactéries et non fastidieux (ex: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*,...etc).

Utilisant 20 tests biochimiques et miniaturisés, qui combinée 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. Ces galeries API 20NE (Biomérieux) sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présentent sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester.

➤ **Technique:**

On prépare la boîte d'incubation et la suspension bactérien comme la technique API 20E.

Pour les tests conventionnels:

Ils sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux, et on remplit uniquement les tubes (et non les cupules) pour tous les tests: NO₃, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG; avec la création d'une anaérobiose dans les tests: GLU, ADH, URE, en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.

Par contre; pour les tests d'assimilation:

Ils sont inoculés avec un milieu minimum (se trouve dans des ampoules d'API AUX Medium) et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

- pour inoculer la galerie, on remplit à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC, avec la suspension bactérienne.

❖ Enfin, on incube à 29°C ± 1C° pendant 24 à 48 heures.

➤ **Lecture:**

La lecture des galeries API 20NE se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation. Sauf les trois premiers tests: NO₃, TRP, GLU qui doivent être lus uniquement à 24 heures, les autres tests lus après 48 heures.

III. L'antibiogramme:

➤ **Principe:**

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques) Selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie 2005 (**CA-SFM. 2005**), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

➤ **Technique:**

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, on racle à l'aide d'une anse de platine une colonie bien isolée, puis on l'ensemence dans 5ml de BHIB et incubée 18h à 37 C° ± 1C°.

A partir de cette culture, on réalise une dilution au 1/100 dans 5ml de l'eau physiologique à 0,9%, la suspension bactérienne est bien homogénéisée; son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08-0,10 à 625 nm ce qui est équivalente à 10⁸ UFC/ml.

L'inoculum peut être ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

On ensemence cette dilution par inondation sur des boîtes de Pétri contenant 25 ml de gélose de mueller-Hinton, puis on aspire le surplus à l'aide d'une pompe à vide et on laisse sécher les boîtes de Pétri 15 à 20 min à la température ambiante.

➤ **Application des disques d'ATB:**

On applique les disques d'ATB à l'aide d'une pince stérile. Pour les B-lactamines, on va les disposer selon le schéma suivant de disposition de **Jarlier et Carbonne. 1995**.

<i>CF</i>	<i>AMX</i>	<i>TIC</i>
<i>FOX</i>	<i>AMC</i>	<i>TCC</i>
	<i>CTX</i>	<i>FEP</i>

Figure N°5: Disposition des antibiotiques sur les boîtes d'antibiogramme selon Jarlier et Carbonne. 1995.

On laisse les boîtes 20 mn à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis on incube pendant 18-24h à 37°C ± 1°C.

➤ *Lecture:*

La lecture se fait par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, et on compare ces résultats aux valeurs critiques figurant dans les tableaux de N°3 et 4. On classe les bactéries dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance.

Tableau N°3 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les *Pseudomonas* et *Acinetobacter* sp (CA-SFM. 2005).

Familles d'Antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		Concentrations critiques (mg/L)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
<i>B-lactamines</i>	Ticarcilline	TIC	75µg	≥ 22	<18	≤16	>64
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≥ 22	<18	≤ 16/2	>64/2
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥21	<15	≤4	>32
	Pipéracilline	PIP	75µg	≥18	<12	≤16	>64
	Imipeneme	IPM	10µg	≥ 22	<17	≤ 4	>8
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Gentamicine	GM	15µg	≥16	<14	≤4	>8
	Tobramycine	TM	10µg	≥16	<14	≤4	>8
<i>Quinolones</i>	Ofloxacine	OFX	5µg	≥22	<16	≤1	>4
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥22	<19	≤1	>2
<i>Autres</i>	Chloramphénicol	C	30µg	≥23	<19	≤8	>16
	Rifampicine	RA	30µg	≥19	<14	≤4	>16
	Tétracycline	TE	20µg	≥19	<17	≤4	>8
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥14	<14	≤32	>32
	Trimethoprime/ Sulfamethoxasole	STX	1.25/23.7 5µg	≥16	<10	≤2/38	>8/152

Tableau N°4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les Entérobactéries (CA-SFM. 2005).

<i>Familles d'Antibiotiques</i>	<i>Antibiotiques testés</i>	<i>Signe</i>	<i>Charge des disques</i>	<i>Diamètres critiques (mm)</i>		<i>Concentrations critiques (mg/L)</i>	
				<i>Sensible S</i>	<i>Résistante R</i>	<i>Sensible S</i>	<i>Résistante R</i>
<i>B-lactamines</i>	Amoxicilline	AMX	25µg	≥ 21	<14	≤4	>16
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≥ 21	<14	≤4/2	>16/2
	Ticarcilline	TIC	75µg	≥ 22	<18	≤16	>64
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≥ 22	<18	≤16/2	>64/2
	Cefalotine	CF	30µg	≥ 18	<12	≤8	>32
	Cefotaxime	CTX	30µg	≥21	<15	≤4	>32
	Cefepime	FEP	30µg	≥21	<15	≤4	>32
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥21	<15	≤4	>32
	Cefoxitine	FOX	30µg	≥22	<15	≤8	>32
	Imipeneme	IPM	10µg	≥ 22	<17	≤ 4	>8
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Gentamicine	GM	15µg	≥18	<16	≤2	>4
<i>Quinolones</i>	Ofloxacine	OFX	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ac.nalidixique	NA	30µg	≥20	<15	≤8	>16
<i>Autres</i>	Chloramphénicol	C	30µg	≥23	<19	≤8	>16
	Nitrofurane	NF	300µg	≥17	<14	≤32	>128
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥14	<14	≤32	>32
	Trimethoprime/ Sulfamethoxasole	STX	1,25/23,75 µg	≥16	<10	≤2/38	>8/152

IV. Tests de détection des BLSE:

Après l'antibiogramme. En cas de réduction de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE ont été mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivants.

Ces tests permettent la mise en évidence de mécanismes de résistance indétectables par les méthodes usuelles.

1. Test de synergie:

➤ **Principe: (Jarlier. 1988).**

Le teste de synergie permet la détection de B-lactamases à spectre étendue chez une souche donnée (Sirot. 1996). Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et au moins un disque de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et cefepime) et ou l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne" .

➤ **Technique:**

La recherche de B-lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30µg, FEP 30µg, CAZ 30µg) à une distance de 20 à 30 mm sur les boites de Pétri. Incubation pendant 18 heures à 37°C ± 1°C.

➤ **Lecture:**

La production d'enzyme d'BLSE se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G (voir figure N°6).

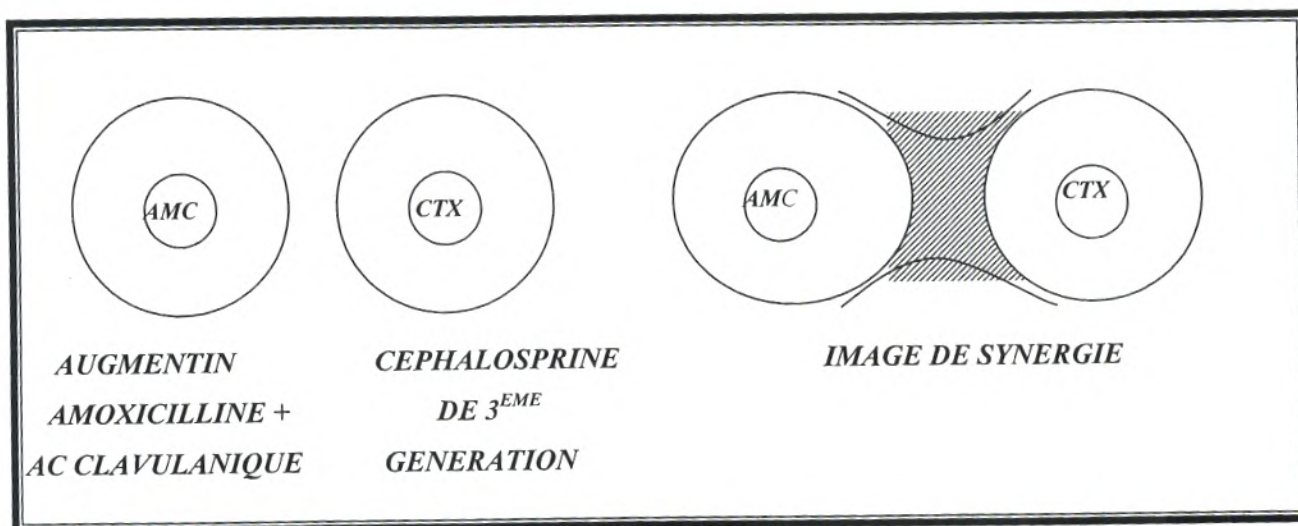


Figure N°6 : Schéma d'une image de synergie (Jarlier. 1988).

2. Test du double disque : (appelé aussi test espagnol):

➤ **Principe:**

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (**Rahal et al. 2005**).

➤ **Technique:**

On procède de la même manière que la technique du test de synergie dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm selon la figure N°7.

On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G).

On incube pendant 18 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

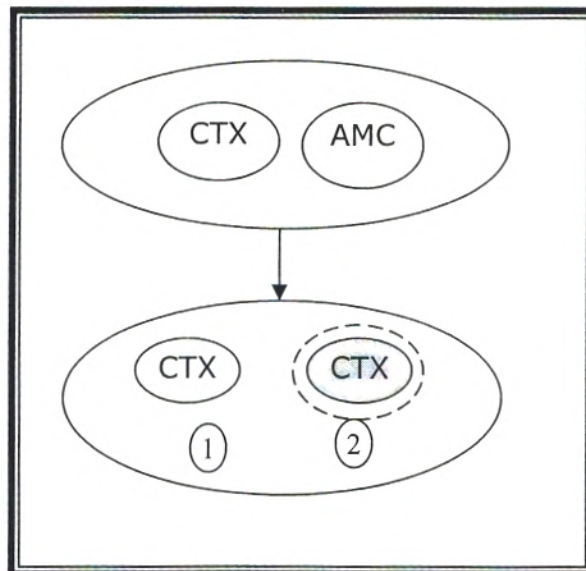


Figure N°7 : Schéma de détection des BLSE par le test du double disque

➤ **Lecture:**

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de troisième génération appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3ème génération.

V. Etude moléculaire des germes isolés:

1- Transfert génétique par conjugaison:

➤ **Principe:**

Dans ce type de transfert, le contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice est indispensable. La mise en évidence de plasmides conjugatifs portants des caractères de résistance aux antibiotiques, se fait par un croisement de la souche sauvage (donatrice) avec une souche réceptrice (ex: *E.coli* K₁₂ NA^R) dépourvue de plasmides et possédant dans ce cas, un caractère de résistance chromosomique (acide nalidixique) auquel la donatrice est sensible.

Les bactéries réceptrices ayant acquis le(s) caractère(s) de résistance aux antibiotiques transférable(s) sont sélectionnées et testées par l'antibiogramme pour déterminer leur profil d'antibiorésistance (**Courvalin et al. 1985**).

➤ **Technique:**

On effectue un isolement des souches donatrices et réceptrices sur gélose nutritive, et après l'incubation pendant 18-24h à 37°C ± 1°C; on cultive à 37°C sous agitation pendant 7h les souches donatrice et réceptrice chacune dans 5ml de BHIB.

Après le traitement de souches par chauffage pendant 10mn à 50°C en bain-marie afin d'empêcher le phénomène de restriction, on mélange 2 volumes de la souche réceptrice avec un volume de la souche donatrice, pour optimiser le contact.

Un dépôt de 100µl du mélange est fait dans une boîte de gélose Mueller-Hinton, et on laisse sécher puis on incube pendant 18-24h à 37°C ± 1°C. Suivant, à l'aide d'une pipette râteau; on racle la culture mixte et la mettre en suspension dans l'eau physiologique.

A partir de cette suspension, on réalise une série de dilutions de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻³ dans l'eau physiologique, on étale des volumes de 100µl de chaque dilution ainsi que la suspension mère sur les boîtes de sélection (Voir annexe pour la préparation des boites de sélection); sans oublier les souches parentales servant de témoins.

En fin, on incube pendant 18-24h à 37°C ± 1°C.

➤ **Lecture:**

On observe s'il y a présence de transconjugants, on les réisole et on réalise leur antibiogramme.

➤ **Souche de référence:**

Nous avons utilisés la souche K₁₂ (*E.coli*), présentant une sensibilité à la plus part des ATB et une résistance chromosomique à l'acide nalidixique (NA^R). La souche K₁₂ a été utilisée comme souche réceptrice pour la conjugaison ainsi que pour tester l'activité des ATB.

2- Extraction d'ADN plasmidique par la méthode de Kado et Liu:

➤ Principe:

C'est une technique rapide permettant l'extraction des plasmides (ADN extra-chromosomiques) de différentes tailles.

En effet, elle est particulièrement bien adaptée à l'extraction des plasmides de petite et de grande taille (>100kb). Elle met à profit les propriétés structurales de l'ADN plasmidique, qui est libérée après la lyse des bactéries sous des conditions qui dénaturent l'ADN chromosomique par traitement à la chaleur et un détergent anionique.

L'ADN chromosomique, les protéines et les débris cellulaires sont éliminés par action du phénol/chloroforme. L'ADN plasmidique se retrouve dans la phase aqueuse où "L'extrait brut" non précipité est analysé immédiatement sur gel d'agarose (**Kado et Liu, 1981**).

➤ Technique:

On centrifuge 3ml de la suspension bactérienne (dans le bouillon BHIB) dans un microtube Eppendorf à 12000 trs/mn pendant 12mn, puis on resuspend le culot bactérien dans 100µl de tampon TE (Tris EDTA).

Suivant, on Ajoute 200µl de la solution de lyse et on mélange par inversion du microtube. Après le chauffage à 60 C° pendant 20 à 25 mns, on ajoute 2 volumes de phénol (Soit un volume de 600µl) et on mélange bien.

En fin, on centrifuge le tout à 12000 trs/mns pendant 12mns, et on récupère la phase supérieure dans un nouveau microtube (Voir annexes pour les solutions utilisées).

3- Electrophorèse d'ADN plasmidique:

Il s'agit d'une technique qui permet de séparer les molécules chargées, sous l'action d'un champ électrique. Dans le cas des molécules d'ADN, la migration dépendra principalement de quatre paramètres (**Sambrook et al. 1989**):

- La taille des molécules d'ADN.
- La concentration du gel d'agarose.
- La différence de potentiel appliqué.
- La conformation de l'ADN présent.

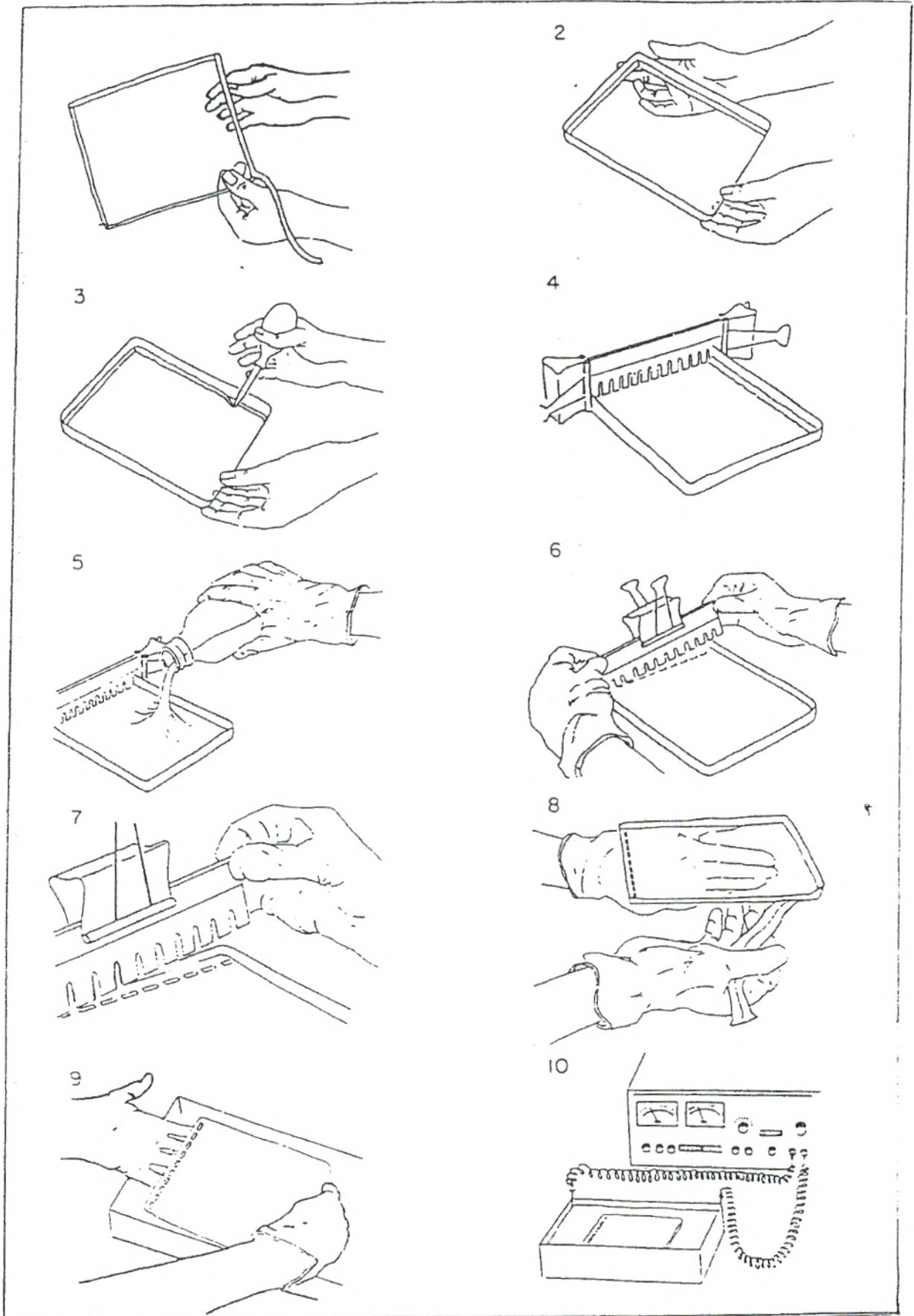


Figure N°8 : Méthode de préparation d'un gel d'agarose (Manniatis et al. 1984).

- Technique:

➤ **Préparation du gel:**

La concentration en agarose est de 0.7% dans le tampon TBE 1X. L'agarose est solubilisé dans un four à micro-ondes. Une fois refroidi (45°C), on verse l'agarose dans un moule pourvu d'un peigne creusant des puits, permettant de déposer les échantillons (Figure N°8).

Lorsque le gel se solidifie, on retire le peigne et les rubans adhésifs qui fermaient les extrémités du moule. Ainsi, l'ensemble gel et moule est placé dans la cuve d'électrophorèse (Photo N°2).

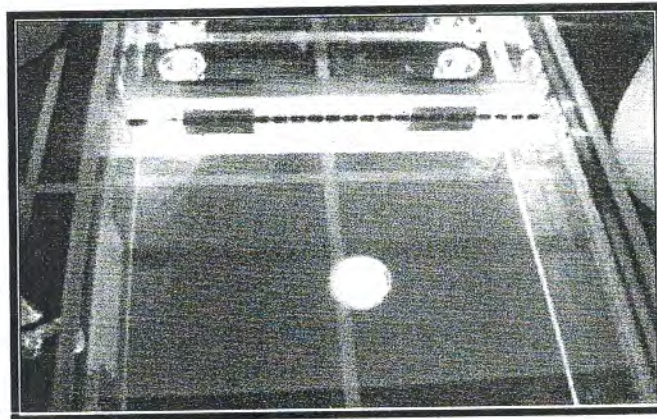


Photo N°2 : Cuve d'électrophorèse.

➤ **Electrophorèse:**

La technique utilisée est celle du gel immergé horizontalement dans le tampon d'électrophorèse TBE 1X. Dans les puits du gel, on dépose un mélange contenant 16µl de la solution d'ADN auxquels on a ajouté 4µl de la solution colorante de bleu de bromophénol et 10µl de Rnase.

La cuve à électrophorèse est alors remplie avec le tampon TBE 1X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé. On branche le générateur après avoir raccordé la cuve environ 4 heures sous une tension de 90 volts (Voir annexes pour les solutions utilisées).

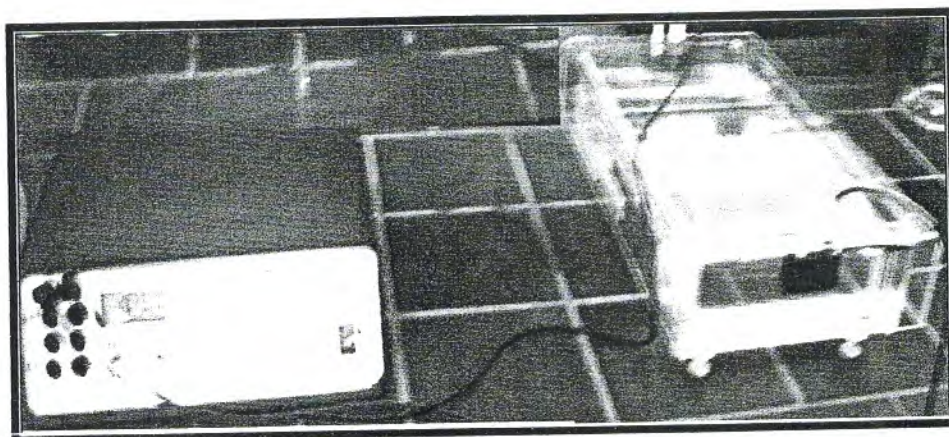


Photo N°3: Appareille d'électrophorèse.

➤ *Visualisation:*

Au terme de la migration, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium ($1\mu\text{g/ml}$) à l'obscurité pendant 1 heure. Le complexe fluorescent ADN-bromure d'éthidium est visualisé sous un transilluminateur à UV. L'ADN coloré par le bromure d'éthidium y apparaît sous forme de bandes fluorescentes, ainsi le gel est photographié avec un appareil polaroïd (Mod-MP4 Lande Camera) avec des pellicules instantanées (polaroïd 615) à travers un filtre orange.

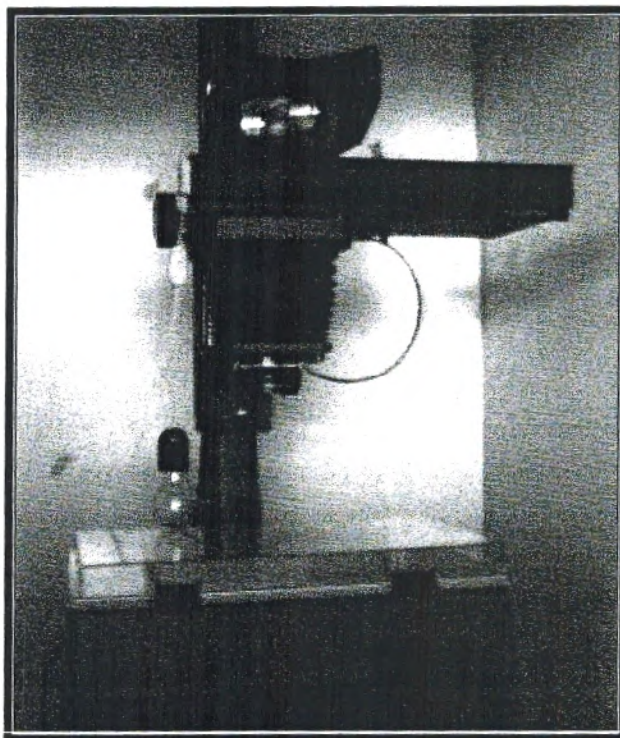


Photo N°4: Appareil transilluminateur.

➤ *Interprétation des profils:*

Comme la mobilité relative de trois formes que peut présenter d'ADN par ordre décroissant est: superhélicoïdale (CCC), circulaire relâché et linéaire (L) (**Manniatis et al. 1984; Courvalin et al. 1985**) et que la migration d'une molécule d'ADN est en fonction de sa taille, sa forme et de la conformation qu'elle peut adapter; les bandes d'ADN obtenus par électrophorèse sont alors comparées avec des plasmides témoins de poids moléculaire" connus, issus de souches traitées de la même manière que les souches à analyser (ex: *E.coli* V517).

VI. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles:

1- Extraction des huiles essentielles:

Les huiles essentielles testées dans ce travail sont fournies par Monsieur BENDAHOU M., laboratoire botanique, université de Tlemcen.

La partie aérienne de ces plantes (*Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata*) a été récoltée au mois de juin 2005 dans les chaînes montagneuses suivants:

↳ *Thymus capitatus* récolté à Tlemcen (Zediga) avec un rendement en huile essentielle de 4,5%.

↳ *Ammoides verticillata* récoltée à Remchi avec un rendement de 3,8%.

Les échantillons ont été ensuite séchés à l'air libre et à l'ombre pendant 10 jours. Les feuilles ont été ensuite isolées du reste de l'échantillon et conservées au frais pour analyses.

Les huiles essentielles ont été isolées par hydrodistillation, l'extraction a duré ±3 heures pour un mélange de 100 à 200 g des feuilles avec 1200 ml d'eau distillée. Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en ml) obtenue pour 100 g de matière végétale sèche.

Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à 4°C dans des tubes sous abri de la lumière jusqu'à leur usage.

2- Souches microbiennes testées:

10 souches bactériennes très résistantes ont été choisies et testées in vitro parmi les germes isolés dans notre étude (2 *Pseudomonas*, 2 *Acinetobacter*, et les Entérobactéries productrices des BLSE et/ou hyperproductrices des céphalosporinases sont : 2 *Klebsiella*, 2 *Enterobacter*, 2 *E.coli*).

3- Méthode de Vincent:

Elle est appelée aussi technique d'aromatogramme (Jacob et al. 1979). Cette méthode consiste à déposer des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés 3µl de l'huile essentielle, testée à la surface du milieu de Mueller-Hinton coulé en boîte de Pétrie, préalablement ensemencée en nappe à l'aide d'une suspension de germe choisi (pour La préparation d'inoculum, c'est la même technique d'antibiogramme).

Après l'incubation pendant 18-24h à 37°C ± 1°C; la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

4- Méthode de contact direct:

(Beylier-Maurel. 1976 modifiée par Bendjillali et al. 1986).

Cette méthode consiste à préparer Une solution de tween 80 à 10% dans l'eau distillée et stériliser à 120 °C pendant 15 minutes.

1ml d'huile essentielle est ajouté aseptiquement à 9 ml de cette solution de façon à ce que le rapport huile essentielle/Tween 80 soit de 20/80. Puis, on agite afin de disperser l'H.E dans la solution, on obtient ainsi la solution mère "SM"; à partir de laquelle on procédera à des dilutions successives afin d'obtenir les différentes concentrations voulues.

Dans des tubes à essais contenant chacun 18 ml de milieu Mueller-Hinton et encore en état de fusion, on ajoute aseptiquement 2 ml de la solution "SM" ou des diverses dilutions de cette solution, de façon à obtenir des concentrations (V/V) en huile essentielle dans le milieu de culture de 10^{-1} à 10^{-3} .

Dans le tube témoin, on ajoute 2 ml de la solution de Tween 80 dans l'eau distillée.

On agite les tubes de milieu, on coule dans des boites de Pétri et on laisse solidifier.

Les suspension bactériennes sont ensuiteensemencés en nappe (pour La préparation d'inoculum, c'est la même technique d'antibiogramme). Après l'incubation 24h à 37 °C ± 1C°; on procède à la lecture des résultats.

Tableau N°5 : Gamme de concentrations des huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

<i>Dilutions</i>	<i>Solution à 15% d'HE</i>	<i>Solution mère à 10% d'HE</i>	<i>10⁻¹</i>	<i>10⁻²</i>	<i>10⁻³</i>
<i>Volume d'HE dans chacune des dilutions en (µl).</i>	1500	1000	100	10	1
<i>Concentration d'HE dans chacune des dilutions en (mg/ml).</i>	147,75	98,5	9,85	0,985	0,0985
<i>Concentration d'HE dans le milieu en (µg/ml).</i>	14775	9850	985	98,5	9,85

5- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI):

Pour déterminer les CMI, nous avons suivi les mêmes étapes que pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, en variant les concentrations de l'huile essentielle dans le milieu gélosé (Tableau N°6).

Tableau N°6 : Gamme de concentrations des huiles essentielles utilisées pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

<i>Dilutions</i>	<i>1/10</i>	<i>1/11</i>	<i>1/12</i>	<i>.....</i>	<i>1/20</i>	<i>....</i>
<i>Volume d'HE dans chacune des dilutions en (µl).</i>	100	90,9	83,33	<i>.....</i>	50	<i>.....</i>
<i>Concentration d'HE dans chacune des dilutions en (mg/ml).</i>	9,85	8,9545	8,2083	<i>.....</i>	4,925	<i>.....</i>
<i>Concentration d'HE dans le milieu en (µg/ml).</i>	985	895,45	820,83	<i>.....</i>	492,5	<i>.....</i>

6- Etude du pouvoir antibactérien pour les combinaisons:

6-1- Pouvoir antibactérien de la combinaison "Antibiotiques-Huiles essentielles":

La technique consiste à préparer des boites de Pétri coulés avec le milieu de Mueller-Hinton contenant les huiles essentielles (*Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata*) aux concentrations de la CMI et la demi CMI pour s'assurer que l'effet observé n'est pas dû uniquement à l'effet des huiles essentielles seule, Donc on applique la même technique utilisée pour la détermination des CMI, puis on dépose à la surface de la gélose les Antibiotiques testés dans l'antibiogramme (Senouci-Bereksi et Abdelouahid. 2005).

Après l'incubation 24h à 37°C ± 1C°, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques des antibiotiques.

6-2- Pouvoir antibactérien de la combinaison "Huile essentielle – Huile essentielle":

Nous avons utilisé la même technique de Vincent décrit précédemment, seulement avant de déposer 3µl de mélange d'H.E à la surface du disque; il faut d'abord homogénéisé au vortex le mélange des huiles essentielles qui composée de deux volumes égaux du *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* combinés (Senouci-Bereksi et Abdelouahid. 2005).

Après l'incubation 24h à 37°C ± 1C°, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques des antibiotiques.

I- Identification de souches:

123 prélèvements ont été analysés, dont 74 ont concerné les prélèvements rectaux chez les patients hospitalisés et tous étaient positifs. Les 49 prélèvements restants ont concerné les sondes d'intubation où 38 d'entre eux ont été positifs.

Au total, 158 souches ont été isolées. Les entérobactéries occupent la première place avec un taux de 56,33%, suivit des *Pseudomonas sp* avec 39,87% et enfin les *Acinetobacter sp* avec seulement 3,80% (Figure N°9).

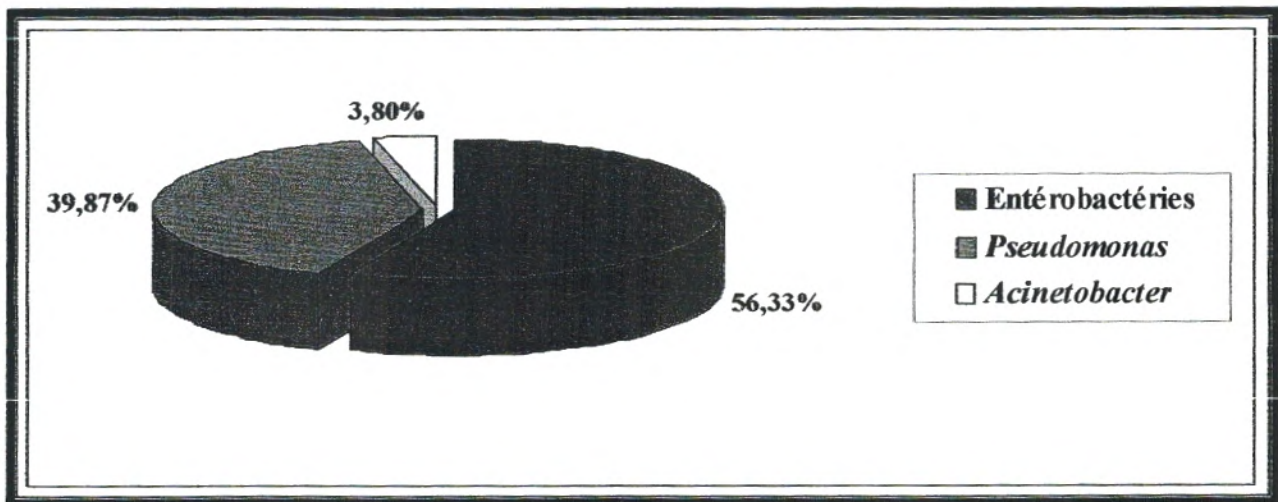


Figure N°9: Répartition de l'ensemble des germes isolés en service de réanimation C.H.U Tlemcen.

112 souches ont été isolées à partir d'écouvillonnage rectal (70,88%), et 46 souches isolées à partir des sondes d'intubation (29,11%).

Selon la figure N°10, les résultats bactériologiques obtenus à partir de ces prélèvements montre une nette prédominance d'entérobactéries avec 77 souches par rapport aux 32 souches *Pseudomonas sp* dans le portage digestif. Les *Klebsiella sp* occupent la première place parmi les entérobactéries avec 33 souches soit 42,86%, les *Enterobacter sp* viennent en deuxième place avec 27 souches, soit 35,06%; et en troisième place *E.coli* avec 13 souches soit 16,88% puis les autres entérobactéries avec un taux de 5,19%.

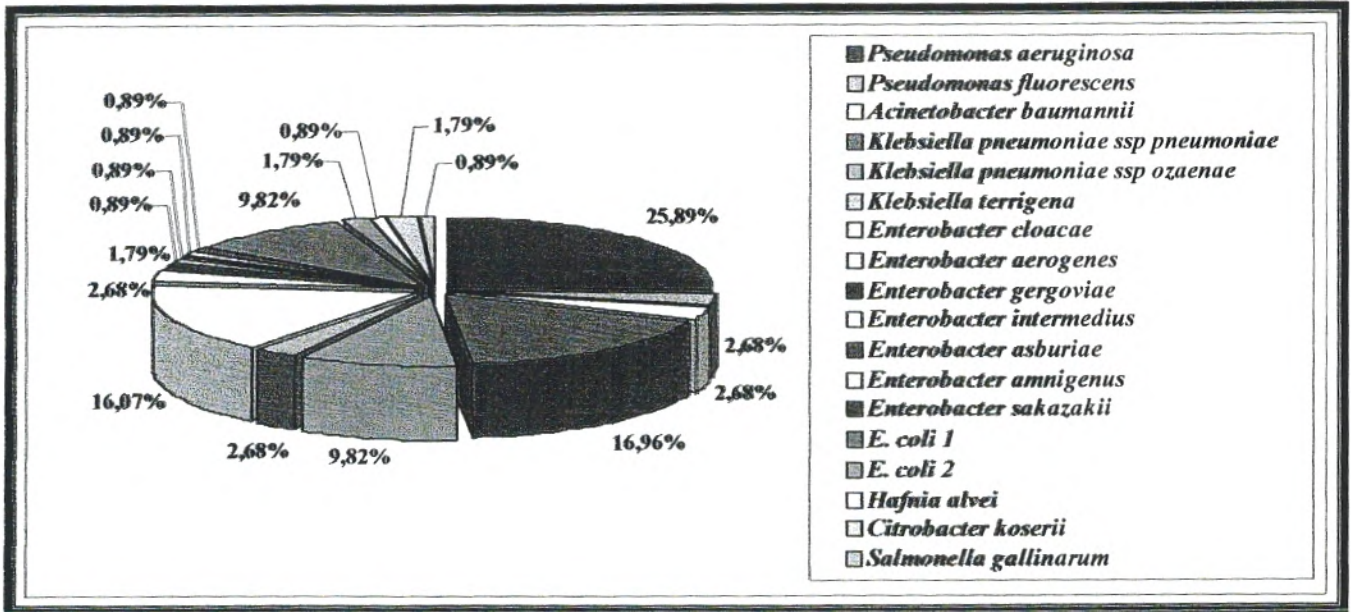


Figure N°10: La fréquence du portage digestif de souches isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

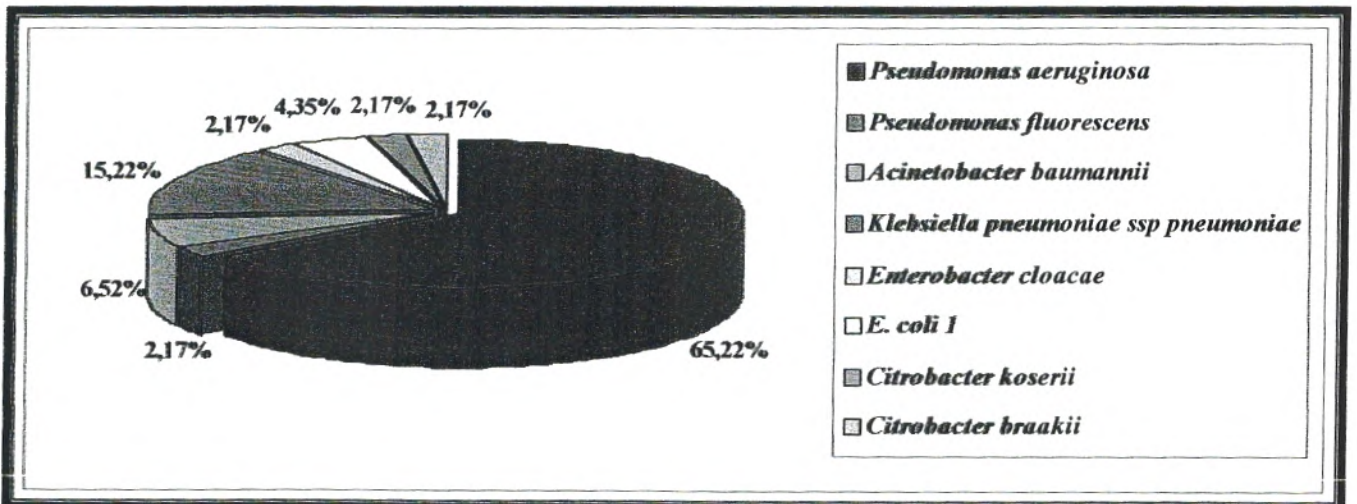


Figure N°11: Répartition de souches isolées à partir des sondes d'intubation chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

A l'inverse des prélèvements digestifs, les sondes d'intubation sont beaucoup plus colonisées par les souches *Pseudomonas sp*, soit 67,39%, et des *Klebsiella sp* avec 15,22% (Voir la figure N°11).

Les entérobactéries isolées de cette étude présentent plusieurs biotypes de diverses espèces; le genre *Klebsiella* est représenté les espèces suivants: *K. pneumoniae ssp pneumoniae*, *K. pneumoniae ssp ozaenae* et les *K. terrigena* respectivement avec les biotypes (1215773, 5215773, 1004552, 1004152, 1004163, 5205552) ; (Voir annexes: Tableaux N°14 et 16).

Les souches *Pseudomonas* isolées à partir des deux réservoirs digestifs et respiratoire se retrouvent avec plusieurs biotypes dont: 1154571, 157551, 2206000, 6206000, 2202000, 2201000. (Voir annexes: Tableaux N°15 et 17).

Trois souches d'*Acinetobacter baumannii* et deux biotypes ont été isolé seulement pour chaque site de prélèvement avec les biotype: 0004042, 0204042 ; voir la photo N°6 comme un exemple.



Pseudomonas aeruginosa: Biotype 1154571 (Plaque API 20NE).



Pseudomonas fluorescens: Biotype 1157551 (Plaque API 20NE).



Pseudomonas fluorescens: Biotype 0146672 (Plaque API 20NE).

Photo N°5: Différentes biotypes isolés chez *Pseudomonas sp* - plaques API 20NE-



Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae: Biotype 5215773 (Plaque API 20E).



Acinetobacter baumannii: Biotype 0004042 (Plaque API 20E).



E. coli 1: Biotype 5144552 (Plaque API 20E).



Pseudomonas aeruginosa: Biotype 2202000 (Plaque API 20E).



E. coli 1: Biotype 5104572 (Plaque API 20E).

Photo N°6: Différentes biotypes de souches isolées - plaques API 20E-

II- Sensibilité de souches aux Antibiotiques:

1- Entérobactéries:

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif responsables d'infections humaines graves.

La surveillance de la sensibilité aux antibiotiques à l'hôpital est une étape essentielle ; elle oriente le choix des traitements empiriques et permet de réduire la pression de sélection exercée par les antibiotiques.

1-1- Par rapport à l'ensemble des Entérobactéries étudiées:

La figure N°12, montre que les germes isolés à partir des patients intubés sont très résistants par rapport aux celles isolées du tube digestif vis-à-vis tous les antibiotiques testés.

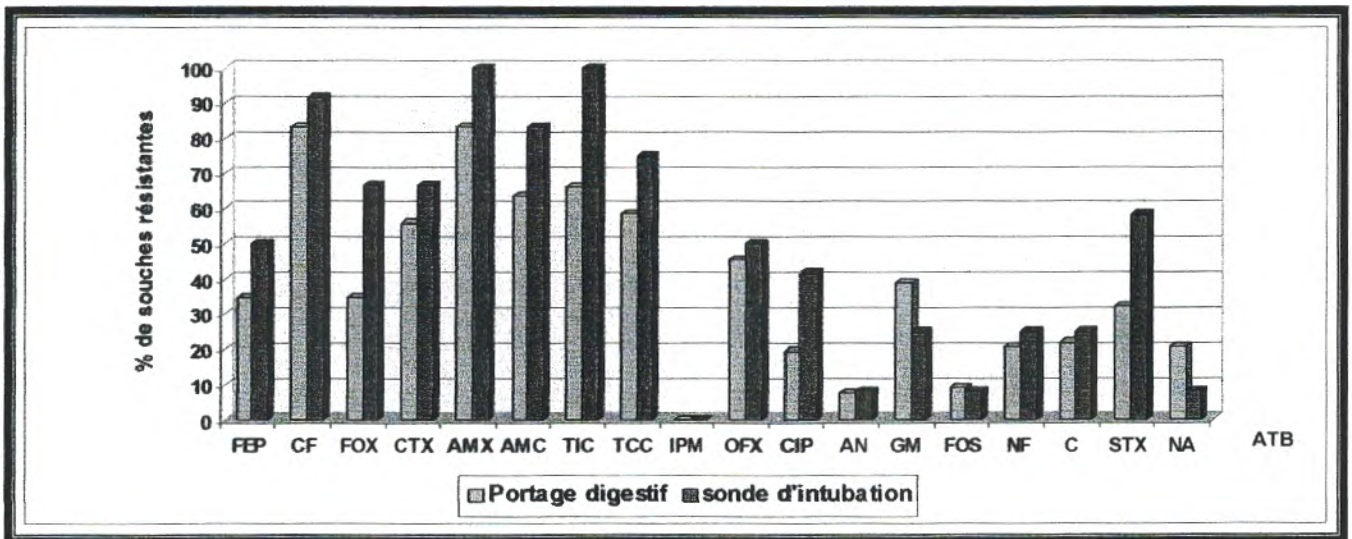


Figure N°12: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches Entérobactéries isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

Il en ressort pour le groupe des pénicillines, une fréquence de résistance très importante chez les souches isolées à partir des sondes d'intubation soit un taux de résistance 100% vis-à-vis la ticarcilline et l'amoxicilline par rapport aux souches isolées de tube digestif qui sont résistantes respectivement à l'ordre de 66,23% et 83,11%.

En ce qui concerne les céphalosporines, on note aussi une résistance importante. La fréquence de résistance vis-à-vis la céfalotine (céphalosporine de 1^{ère} génération) est estimée à 87,38%.

Pour les céphalosporines de 3^{ème} génération, on observe une sensibilité très diminuée où ils sont inactifs sur la moitié de souches isolées.

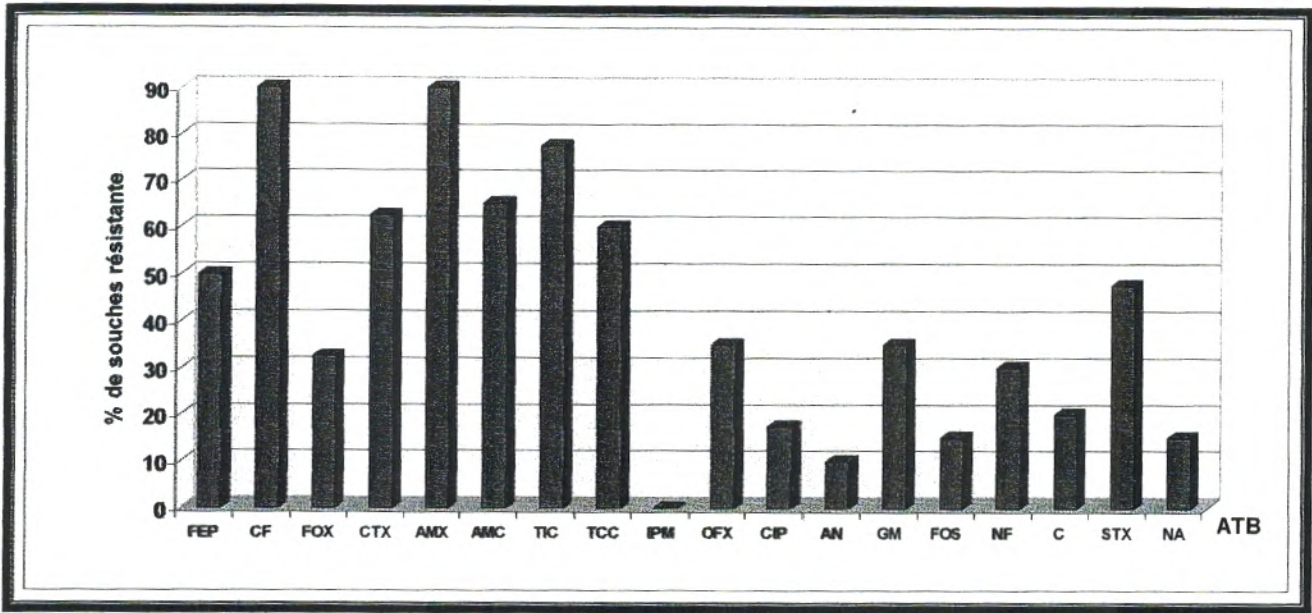


Figure N°13: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches Klebsiella isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

Pour les aminosides, un bon niveau de sensibilité à l'amikacine soit un taux de sensibilité 90%. Par contre, les gentamicines sont toutefois moins efficaces avec de 65% de sensibilité.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec les fluoroquinolones, sont respectivement 90% et 65 % de sensibilité vis-à-vis les ciprofloxacines et l'ofloxacines.

Bonne activité des autres classes d'antibiotiques (fosfomycine, chloramphénicol, ac.nalidixique) à l'exception des triméthoprimes/sulfamides auxquels 47,5% des souches sont résistantes.

La résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline correspond à une résistance naturelle de cette espèce par sécrétion d'une pénicillinase naturelle.

La résistance aux céphalosporines est liée à la sécrétion de β -lactamases à spectre étendu (BLSE).

Ce mécanisme est souvent associé à la résistance aux aminosides, aux fluoroquinolones, rendant compte du caractère souvent multirésistant des souches responsables d'infections nosocomiales (Mainardi et Gutmann. 1998).

❖ *Enterobacter*:

Les souches *Enterobacter* présentent une résistance importante vis-à-vis les aminopénicillines (AMX) et les carboxypénicillines. Les taux de résistance sont respectivement de 92,86% et 85,71% (Voir la figure N°14).

Concernant la résistance aux inhibiteurs de B-lactamases, L'effet de l'AMX + acide clavulanique (AMC) et la TIC + acide clavulanique (TCC) sont traduits par une assez forte fréquence de résistance évaluée respectivement à 75% et 71,43%. Nous constatons que ces fréquences sont élevées chez les souches *Enterobacter* par rapport aux souches *Klebsiella* avec un taux de 10%.

On note pour ces *Enterobacter*, une forte résistance vis-à-vis les céphalosporines de 1^{ère} génération (CF), soit un taux de 82,14%. Cette résistance était également observée que le genre *Klebsiella*.

Concernant l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération, on note que le céfépime FEP reste relativement active sur les souches isolées avec un fréquence de sensibilité de 71.43%. Contrairement à céfotaxime CTX où la fréquence de résistance augmente jusqu'à 60,71%.

Pour les céphamycines, la résistance à céfoxitine est relativement moyenne soit 50%. On peut remarquer que contrairement aux Klebsielles, le genre *Enterobacter* persiste une augmentation au niveau du résistance vis à vis cet antibiotique presque le double.

L'imipénème reste l'antibiotique de choix avec 100% des souches sensibles.

Parmi les aminosides, c'est l'amikacine qui reste active sur la majorité des souches *Enterobacter*, soit 90% des souches sensibles. Par contre, la sensibilité à gentamicine est diminuée jusqu'à 65% des souches sensibles.

On remarque aussi une résistance assez importante aux fluoroquinolones, surtout à l'ofloxacin que le ciprofloxacine; avec des taux respectifs de l'ordre de 60,71% et 35,71%.

Les autres molécules d'antibiotiques (fosfomycine, ac.nalidixique, et les furanes) sont encore en majorité actives à l'exception des trimethoprimes/sulfamides et chloramphénicol dont 42,86% et 35,71% des souches sont résistantes.

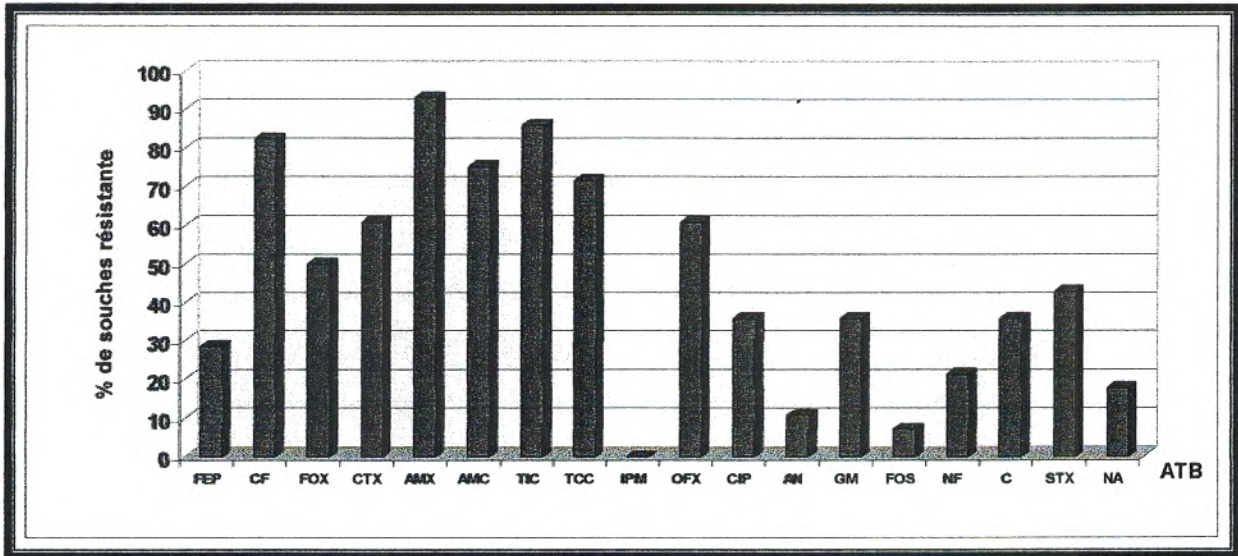


Figure N°14: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches Enterobacter isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

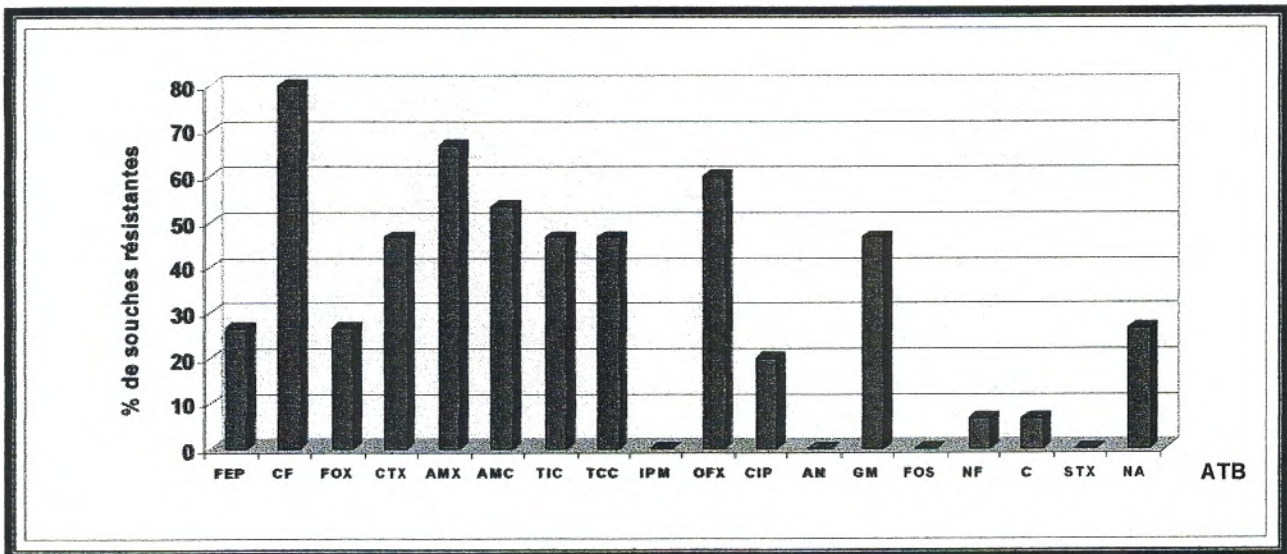


Figure N°15: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches E.coli isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

❖ *Escherichia coli*:

Selon la figure N°15, on rapporte généralement une diminution moyenne du taux de résistance aux ATB. Ce résultat diffère de celui retrouvé aux *Klebsiella* et *Enterobacter*.

L'élément le plus important à souligner est la présence de souches productrices de B-lactamases résistantes aux B-lactamines. Environ 66,67% des souches sont résistantes (catégories R et I) à l'amoxicilline et 53,33 % restent résistantes à son association avec l'acide clavulanique.

Pour la résistance aux carboxypénicillines, on constat un taux de résistance stable à la ticarcilline et à son association avec l'acide clavulanique; soit un fréquence 46,67% de souches résistantes.

46,67% de souches isolées étaient de résistance diminuée aux céphalosporines de troisième génération (R ou I): céfotaximes, et 26,67% vis-à-vis l'antibiotique céfépime. Mais il reste toujours une forte résistance aux céphalosporines de première génération (céfalotines) avec un taux de 80%. L'imipénème reste l'antibiotique de choix qui inhibe la croissance de toutes les souches isolées, quant aux céphamycines (céfoxitines); on observe seulement 26,67% de souches résistantes.

Pour les aminosides, l'amikacine est actif sur la totalité des souches de colibacille avec une sensibilité totale. Mais on peut remarquer que contrairement à ce résultat, elles persistent une augmentation de résistance à la gentamicine avec plus de 45% des souches résistantes.

On remarque, une augmentation importante de la résistance vis-à-vis les quinolones, soit un fréquence de 60% de souches résistantes à l'ofloxacine.

Les souches résistantes aux autres classes d'antibiotiques restent exceptionnelles, on note une sensibilité totale (100%) vis-à-vis la fosfomycine et trimethoprime/sulfamide, et une sensibilité de 93,33% à chloramphénicol et les furanes. A l'exception à l'ac.nalidixique où on observe une diminution de sensibilité soit 73,33% de souches sensibles.

2- Pseudomonas:

La résistance de 63 souches du bacille pyocyanique aux antibiotiques ne montre pas d'une nette différence entre les deux types de prélèvements, on révèle presque les mêmes allures de résistance, que ce soit en nombre d'antibiotiques testés ou vis-à-vis de chaque ATB.

Selon la figure N°16, ces souches résistent le plus souvent aux 7, 8, 9, 11 ATB ; et peuvent aller jusqu'à 12 et 13 ATB essentiellement pour les prélèvements rectaux (Voir la photo N°7).

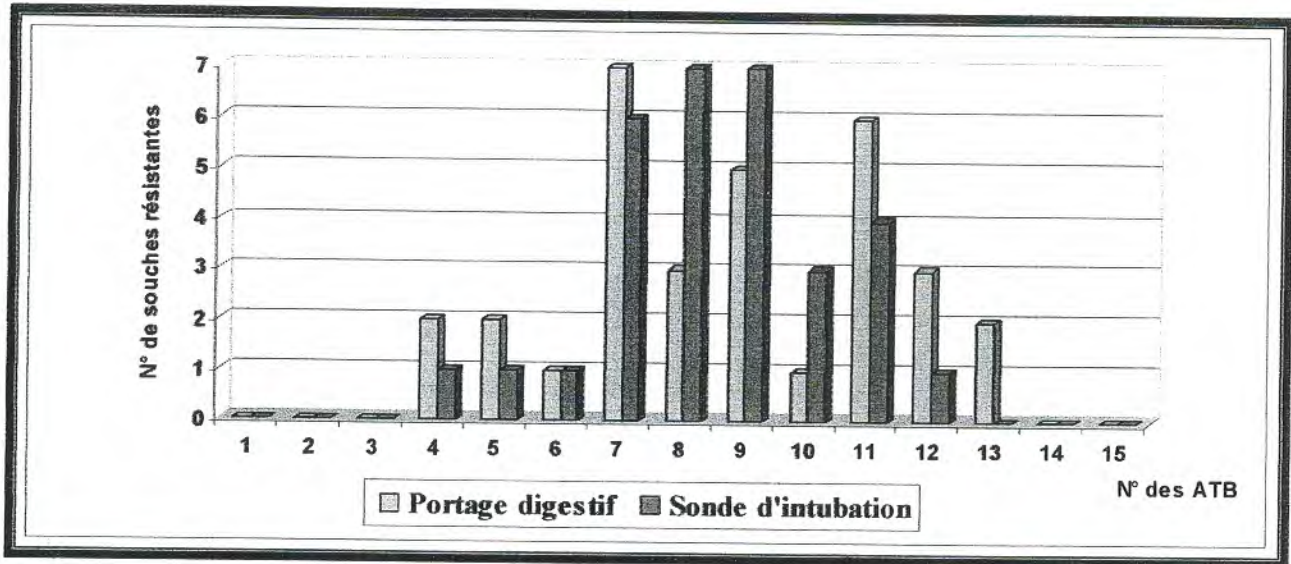


Figure N°16: Fréquence de résistance aux nombres d'antibiotiques de souches Pseudomonas isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

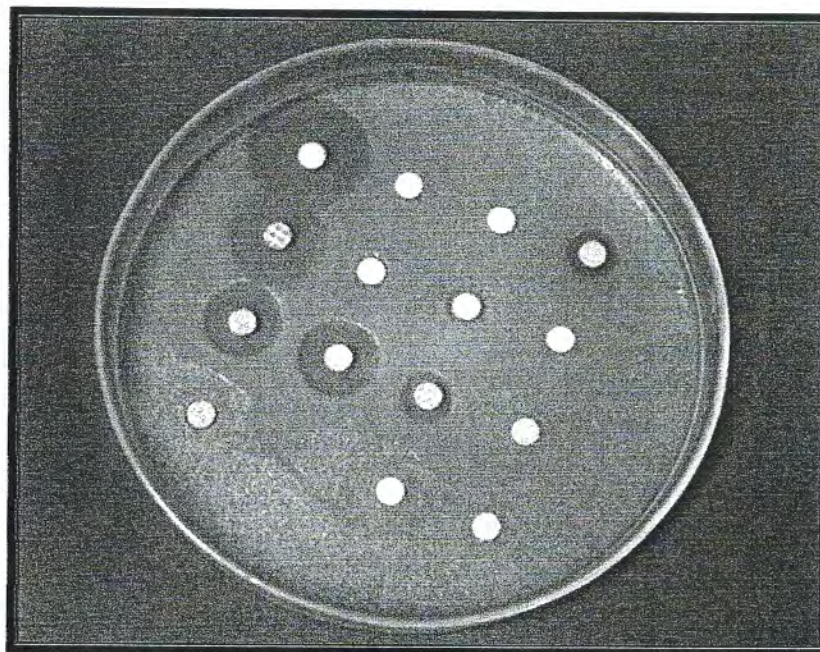


Photo N°7 : L'antibiogramme de Pseudomonas aeruginosa résistante aux 12 ATB.

Pour la résistance aux B-lactamines: La majorité des souches sont résistantes à la ticarcilline et la ticarcilline + ac.clavulanique soit des taux respectifs de 90% et 85%. Parmi les cinq B-lactamines étudiés, l'imipénème présente la meilleure activité par rapport aux autres B-lactamines avec seulement trois souches résistantes dont une souche isolée à partir des sondes d'intubation. La ceftazidime est inactive sur 27% de souches. La fréquence de souches résistantes à la pipéracilline est 35,8% (Figure N°17).

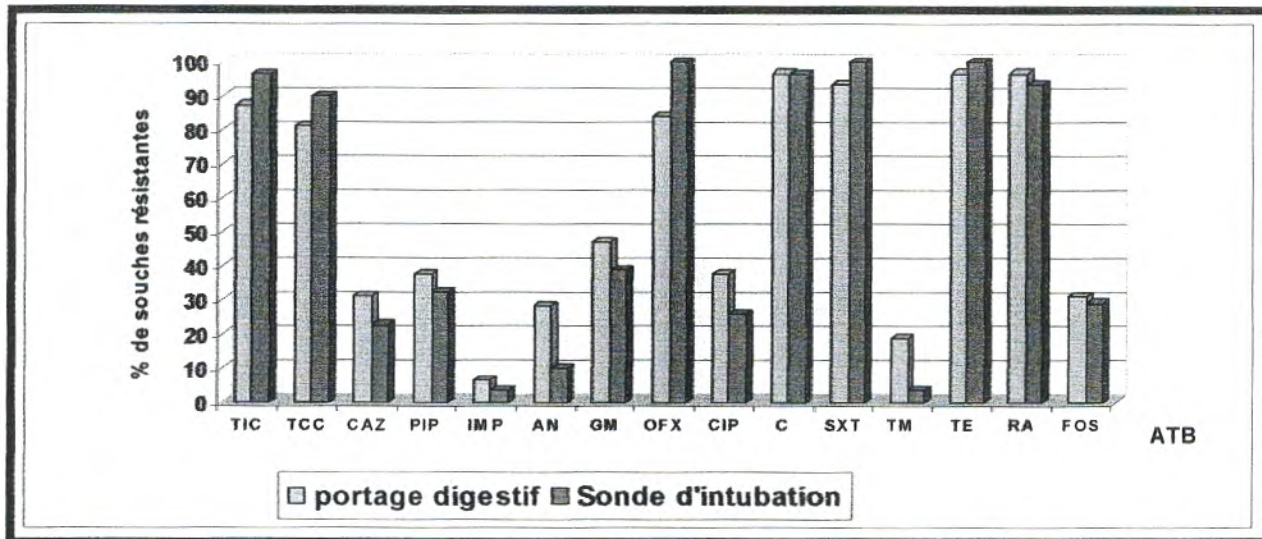


Figure N°17: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches *Pseudomonas* isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

Parmi les aminosides, qui représentent l'une des familles actives sur *P. aeruginosa* in vitro et in vivo, la gentamicine a perdu son activité dont 42,8 % des souches sont résistantes.

L'amikacine est actif surtout sur les souches isolées à partir des sondes d'intubation avec 9,6% seulement des souches résistantes, contrairement aux souches isolées par écouvillonnage rectal où on trouve 28,1% des souches sont résistantes.

La tobramycine garde la meilleure activité puisque 96,8% des souches isolées à partir des sondes d'intubation sont encore sensibles à cet antibiotique, et 81,2% des souches sensibles dans les prélèvements rectaux.

Pour les quinolones, la ciprofloxacine est restée efficace sur 70% des souches in vitro. Contrairement à l'ofloxacine où la résistance est totale 100% pour toutes les souches isolées à partir des sondes d'intubation et 84,37% pour les souches de réservoir digestif.

Par contre, la résistance aux autres antibiotiques est très importante, elle varie entre 93,5% et 100%. À l'exception des fosfomycines dont 70% des souches ont une sensibilité diminuée.

3- Acinetobacter:

Les résultats de l'antibiogramme réalisés sur les 6 souches d'*Acinetobacter baumannii*, révèlent la multirésistance de cette espèce essentiellement les souches isolées dans le portage digestif.

Selon la figure N°18, on note une résistance totale de ces germes vis-à-vis la ticarcilline et la ticarcilline + ac.clavulanique qui correspond à une résistance naturelle de cette espèce par sécrétion d'une pénicillinase naturelle.

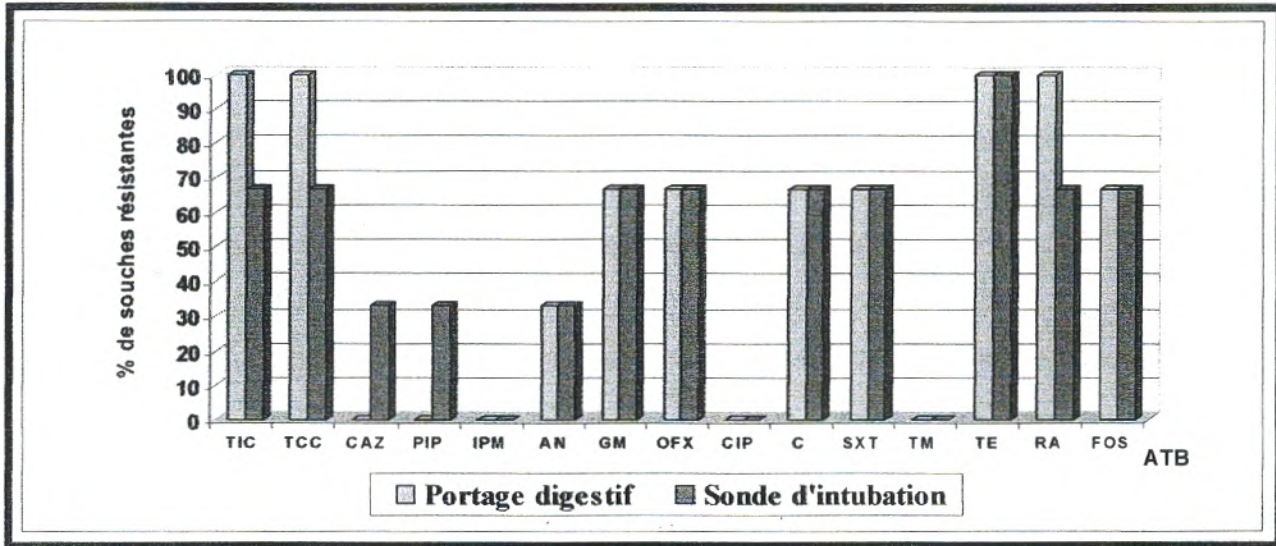


Figure N°18: Fréquence de résistance aux antibiotiques de souches d'*Acinetobacter* isolées chez les patients hospitalisés dans le service de réanimation - C.H.U Tlemcen -

Bonne activité des autres classes des B-lactamines (la pipéracilline et à la ceftazidime) à l'exception d'une souche résistante isolée par écouvillonnage rectal.

L'imipénème reste l'antibiotique de choix avec 100% des souches sensibles.

Parmi les aminosides, la tobramycine reste active sur toutes les souches isolées.

Par contre, la résistance aux autres antibiotiques (chloramphénicol, fosfomycine, et triméthoprime/sulfamide) est importante; soit 66,67% ; et 100% aux tétracyclines.

A noter enfin, une excellente sensibilité aux ciprofloxacines avec 100% de souches sensibles.

III- Détection de B-lactamases à spectre étendue chez les souches sauvages:

Les B-lactamases à spectre étendue BLSE ou ESBL (: Extended-spectrum β -lactamase) ont une importance particulière en raison de la haute probabilité d'échec lors d'utilisation empirique d'antibiotiques en l'absence d'antibiogramme. Ceci est associé à une morbidité et une mortalité élevées, à une prolongation de la durée de l'hospitalisation et à une augmentation des coûts (Paterson et al. 2001).

Parmi les 88 patients hospitalisés, 18 (20,45%) ont été colonisés par une ou plus d'EBLSE. Quatre patients étaient colonisés dès leur admission (mais ils avaient tous été préalablement hospitalisés dans les autres services du C.H.U Tlemcen) et 14 (soit 17%) ont acquis une EBLSE ou plus au cours de leurs hospitalisation.

Le délai moyen d'acquisition digestive d'une EBLSE était de 3 jours \pm 21 jours. La probabilité d'acquisition (nombre de patients ayant acquis un portage digestif d'EBLSE) était de 10% pendant la première semaine d'hospitalisation, 55% au la deuxième semaine, et 35% au 21^{ème} jours.

Parmi les 20 souches d'Entérobactéries productrices de B-lactamases à spectre étendue, 18 souches (soit 90%) sont responsables d'une colonisation digestive et deux seulement (soit 10%) isolées à partir des sondes d'intubation.

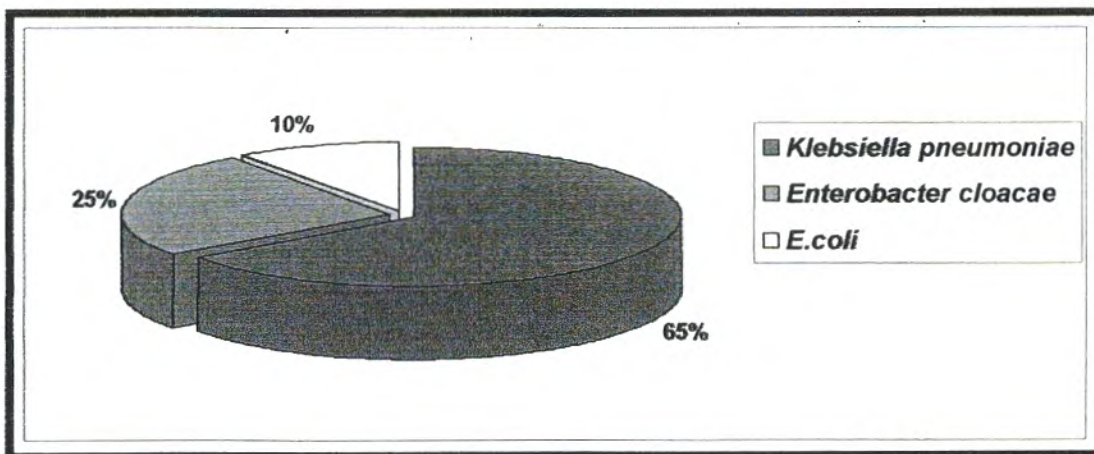


Figure N°19: Répartition des Entérobactéries productrices des BLSE responsables d'une colonisation digestive.

Klebsiella pneumoniae a été retrouvée chez 13 patients colonisées ou infectés (soit 72,2%), *Enterobacter cloacae* chez 5 patients (soit 27,7 %) et *Escherichia coli* chez deux patients (soit 11,1%) (Figure N°19).

En outre, 16 patients (88,8%) ont été colonisés ou infectés par une seule espèce d'EBLSE, et deux patients (11,1%) colonisés ou infectés par deux EBLSE différentes.

Ces enzymes sont recherchées par deux tests : Test de synergie et Test de double disque.

L'utilisation de premier test (test de synergie) se traduit par une image de synergie entre un disque d'AMC et au moins un disque de céphalosporine de troisième génération (CTX, FEP, CAZ), placé à 3, 2.5, ou 2cm centre à centre (**Thomson et Sanders. 1992**).

La comparaison entre les deux méthodes de détection des BLSE, montre que les deux sont essentielles et l'une complémentaire à l'autre. En effet, l'image de synergie permet de différencier le phénotype BLSE chez les souches productrices de Case (céphalosporinase), selon **Vedel et al. 1994**. C'à vous dire la synergie observée vis-à-vis le nombre de C3G, et avec quel antibiotique de C3G (la synergie entre l'augmentin et le CTX ou le FEP....).

Cette image de synergie obtenue peut aussi avoir différentes formes: en bâtonnet, en bouchon de champagne (Ex: Photo N°8).

Mais dans certain cas, la forte résistance de certains germes; empêche la formation de synergie (comme exemple: le cas des *Enterobacter*). Pour cela, on utilise le test de double disque pour confirmer est ce que la souche produit les BLSE ou non.

Ce test se traduit par l'augmentation du diamètre d'inhibition autour de disque de C3G (précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant le même céphalosporine). Donc, une augmentation supérieure ou égale à 5 mm de diamètre de cette zone a été considérée comme indicatrice de la production de BLSE.

Les tests de sensibilités aux antibiotiques des 20 souches d'entérobactéries productrices des BLSE (Tableau N°7), ont montré un fort taux de résistance à la céfotaxime (100%) et un taux moindre à la ceftazidime (70%), évoquant une activité cefotaximase prédominante et une activité ceftazidimase secondaire, on a observé également une diminution significative de niveau du résistance à la céfépime (40%).

On peut remarquer également des résistances croisées à la gentamicine, l'amikacine, et les fluoroquinolones.

- des résistances croisées aux aminosides (la gentamicine, et/ou l'amikacine) pour toutes les souches et leurs transconjugants. Donc, nous amène à dire que les gènes codant la résistance aux aminosides sont portés sur des plasmides transférables.
- La différence observée dans le profil de résistance entre En₁₇ et TC En₁₇ pourrait s'expliquer par le fait que la souche En₁₇ synthétise deux B-lactamases:
 - Une plasmidique de type BLSE transmise à *E.coli* K₁₂ donnant le TC En₁₇ hydrolysant les pénicillines et les C3G.
 - Une chromosomique de type céphalosporinase exprimée à haut niveau, non transférable hydrolysant le FOX (céphamycine).
- Le fait que la résistance intermédiaire au FEP chez K₂₃ soit devenue nulle chez TC K₂₃ peut s'expliquer, soit par l'effet concomitant des deux B-lactamases chez K₂₃, soit par une perméabilité plus élevée de la membrane à cet antibiotique chez TC K₂₃, soit à une atténuation de l'expression génique due à un environnement physiologique différent. Mais aussi comme le cas précédent, par l'existence de deux B-lactamases dont l'une est transférable.
- La résistance aux autres antibiotiques (Fluoroquinolones, Furanes, Sulfamides) n'est pas transférée chez les transconjugants, cela peut être expliqué que les gènes codant la résistance aux ces antibiotiques sont portés par un autre plasmide non transférable ou alors due à des mutations qui affectent leur transport actif.

B/29.101
2007 11

Tableau N°8: Résultats de l'antibiogramme de 5 souches donatrices (phénotype BLSE), leurs transconjugants et la réceptrice (E.coli K₁₂).

ATB	Les souches										
	K ₂₃	TC. K ₂₃	K ₃₂	TC. K ₃₂	K ₂₉	TC. K ₂₉	En ₁₇	TC. En ₁₇	En ₉	TC. En ₉	E.coli K ₁₂
FEP	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
FOX	S	S	I	I	S	S	R	S	S	S	S
CTX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CAZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AMX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AMC	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
TIC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
TCC	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
IPM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
OFX	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
AN	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
GM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
FOS	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
NF	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
C	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S
STX	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S
NA	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R

TC : Les souches transconjugantes

V- Isolement des plasmides:

La recherche des plasmides est un complément nécessaire pour la comparaison et le suivi de l'évolution des souches pathogènes.

Parmi les 20 souches d'entérobactéries productrices des B-lactamases à spectre étendue (BPBLSE), 5 souches seulement qui ont été extrait et analysée leurs contenu plasmidique: 3 *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* et 2 *Enterobacter cloacae*.

Les extractions plasmidiques ont été effectuées par la méthode de **Kado et Liu**.

Les plasmides ont été visualisés après la migration en gel d'agarose à 0,7% et coloration par bromure d'éthidium. La taille des plasmides a été comparée à celle des Marqueurs (**Piddock et al. 1997**).

Cette analyse du contenu plasmidique des BPBLSE isolées dans notre étude, a montré que les trois souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent des plasmides avec 4 profils différents dont deux bandes plasmidiques ont été à haut poids moléculaires et les deux autres bandes ont été de faible poids moléculaires (Figure N°20).

Trois profils plasmidiques différents ont été observés chez *Enterobacter cloacae* dont tous ces profils comprennent des bandes plasmidiques à haut poids moléculaire.

Pour les souches transconjugantes, on observe le même profil plasmidique chez toutes les souches analysées que ce soit les souches *Klebsiella sp* ou *Enterobacter sp*; avec des bandes plasmidiques de même taille soient un poids moléculaires de 60 kb.

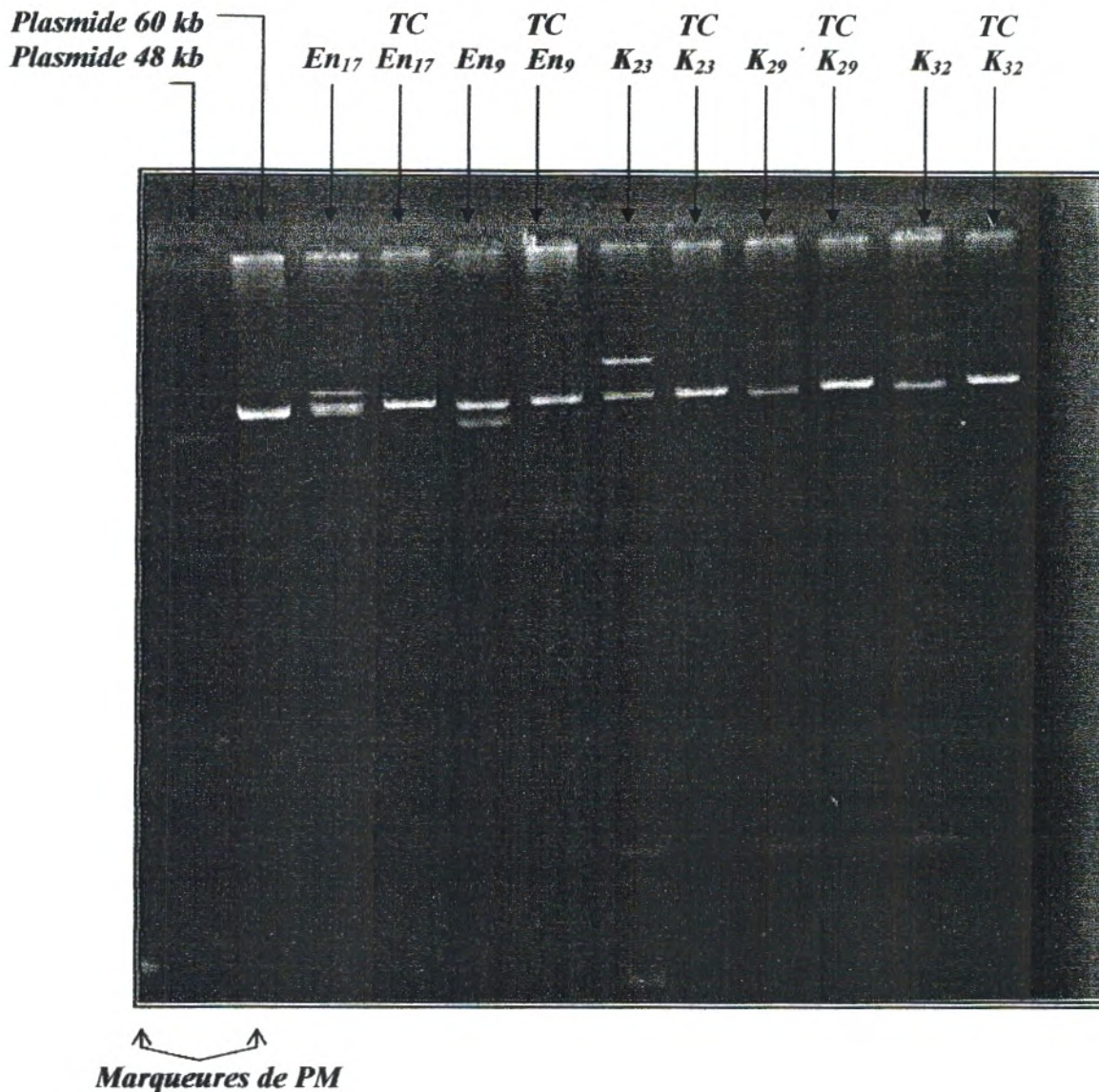


Figure N°20: Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique de 5 souches d'entérobactéries phénotype BLSE ainsi que leurs transconjugantes extrait par la méthode de Kado et Liu.

Noter la présence deux bande plasmidique différentes à haut PM chez toutes les souches sauvages des *Klebsiella* et trois bandes différentes à haut PM chez les souches d'*Enterobacter*.

Et également, la présence de 1 à 2 bandes plasmidique de faible PM chez toutes les souches sauvages de *Klebsiella*.

VI- Effet antibactérien des huiles essentielles:

1- Méthode de Vincent:

L'activité antimicrobienne par la méthode de Vincent est déterminée en terme du diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques.

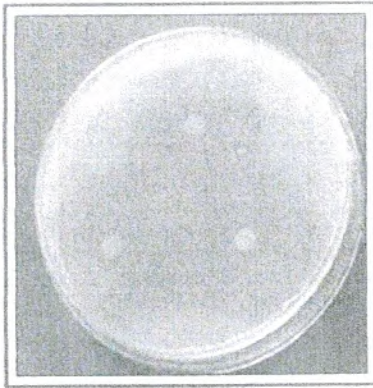
Les résultats du ce test sont résumés dans le tableau N°9.

Les huiles essentielles de *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* témoignent d'une activité antibactérienne intéressante. Il faut signaler que l'huile essentielle de *Thymus capitatus* révèle une meilleure activité que le 2^{ème} huile contre la majorité de souches d'entérobactéries et *Acinetobacter* testées, pour cela; une étude par contact direct avec le calcule des CMI est réalisée seulement avec cette huile essentielle. (Voir photo N°12).

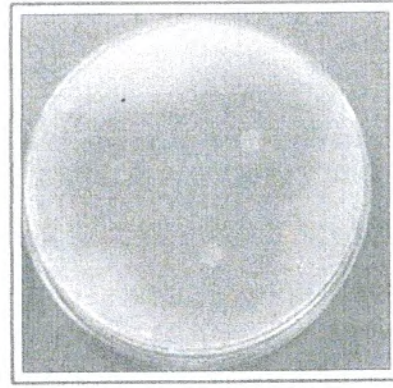
De plus, ces huiles se révèlent pratiquement sans effet, in vitro, sur les souches *Pseudomonas sp.*

Tableau N°9: Antibio-aromatogramme: Moyennes des diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches testées (en mm) selon la méthode de Vincent.

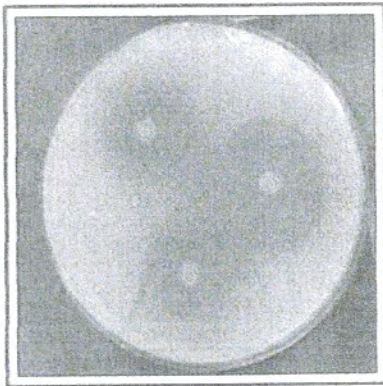
<i>Souches</i>	<i>Huiles essentielles de Thymus capitatus Diamètres en mm</i>	<i>Huiles essentielles d'Ammoides verticillata Diamètres en mm</i>
<i>K₄</i>	33	20,17
<i>K₅</i>	29,33	19,83
<i>En₁₂</i>	28	18
<i>En₁₇</i>	30	17
<i>E₉</i>	33	22
<i>E₁₄</i>	34,67	24,33
<i>P₅₀</i>	14,83	R
<i>P₅₂</i>	R	R
<i>A₁</i>	39	32
<i>A₂</i>	38,33	29



Klebsiella pneumoniae K₄



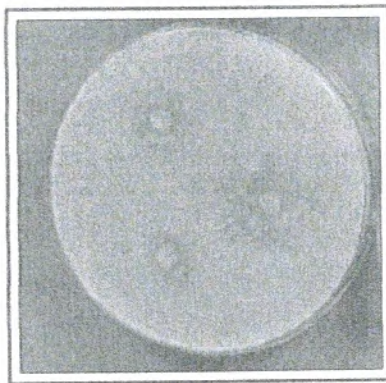
Acinetobacter baumannii A₁



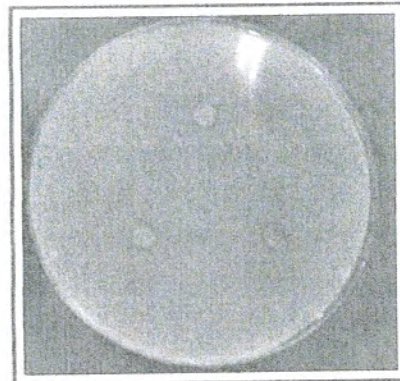
Enterobacter cloacae En₁₂



Enterobacter cloacae En₁₇



Pseudomonas aeruginosa P₅₀



Pseudomonas aeruginosa P₅₂

Photo N°12 : Antibiogramme de souches testées vis à vis les huiles essentielles de: *Thymus capitatus* (à gauche) et *Ammoides verticillata* (à droite).

2- Méthode de contact direct:

Les résultats obtenus par la technique de contact direct sont représentés dans le tableau N°10.

Tableau N°10: Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle *Thymus capitatus*
 Selon la méthode de contact direct.

Dilutions Souches	Témoin	Solution à 15% d'HE	Solution mère à 10% d'HE	1/10 (985 µg/ml)	1/20 (492,5 µg/ml)	1/30 (328,33 µg/ml)	1/40 (246,25 µg/ml)	1/50 (197 µg/ml)	1/60 (164,16 µg/ml)
<i>K₄</i>	++	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>K₅</i>	++	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>En₁₂</i>	++	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>En₁₇</i>	++	-	-	-	-	++	++	++	++
<i>E₉</i>	++	-	-	-	-	-	-	+	++
<i>E₁₄</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P₅₀</i>	++	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>P₅₂</i>	++	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>A₁</i>	++	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>A₂</i>	++	-	-	-	-	-	++	++	++

Ce tableau indique que toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle *Thymus capitatus* avec des dilutions inférieures 1/30 (soit 328,33 µg/ml). Alors que les deux souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été sensibles à des dilutions inférieures à 1/40 (soit 246,25 µg/ml).

Une meilleure sensibilité détectée pour *E. coli* où on révèle une absence de croissance à partir des dilutions inférieures ou égales à 1/50 d'HE (soit 197 µg/ml)

Contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*, où on observe que l'huile essentielle *Thymus capitatus* reste inactive ; sans aucun effet. On remarque que ce germe est résisté même à une concentration de 15% d'huile essentielle.

3- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI):

Le Tableau N°11, résume les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle *Thymus capitatus* obtenue par la méthode de contact direct en milieu gélosé.

La concentration minimale inhibitrice est correspond à la plus petite concentration d'huile essentielle qui inhibe la croissance bactérienne.

Donc d'après ce Tableau, on conclue deux points essentiels:

- Les souches *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus résistantes.
- Les souches *Escherichia coli* sont les plus sensibles (faible CMI).

Tableau N°11: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle *Thymus capitatus* vis-à-vis les souches bactériennes.

<i>Souches bactériennes</i>	<i>concentrations minimales inhibitrices (CMI) (µg/ml)</i>
<i>P₅₂</i>	> 14775
<i>P₅₀</i>	> 14775
<i>En₁₇</i>	469,047
<i>En₁₂</i>	447,727
<i>K₅</i>	428,26
<i>K₄</i>	378,84
<i>A₂</i>	289,70
<i>A₁</i>	281,42
<i>E₉</i>	205,208
<i>E₁₄</i>	197

4- Etude du pouvoir antibactérien par combinaisons:

4-1- Combinaisons : Antibiotiques – Huiles essentielles:

Les résultats du test de combinaison entre l'huile essentielle *Thymus capitatus* et les antibiotiques pour les isolats cliniques (par la méthode classique de diffusion en disques sans oublier que l'huile essentielle est incorporée dans la gélose à des concentrations CMI et demi CMI) sont représentés dans le tableau N°12.

Tableau N°12: Diamètres des zones d'inhibitions du test de combinaisons "Antibiotiques – Huiles essentielles" (les diamètres en mm).

Souches	Concentrations des HE (µg/ml)	Diamètres des zones d'inhibitions par antibiotiques testés (en mm)									
		FEP	CF	FOX	CTX	AMX	AMC	TIC	TCC	CIP	GM
K₄	CMI (378,84)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (189,42)	17,5	R	16,5	10	R	15	R	17,5	21	R
K₅	CMI (428,26)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (214,13)	17,5	R	17	11	R	14,5	R	15	16	R
En₁₂	CMI (447,727)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (223,86)	12,5	R	R	R	R	R	R	R	20	R
En₁₇	CMI (469,047)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (234,52)	13	R	R	R	R	R	R	R	23	R
E₉	CMI (205,208)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (102,604)	15	R	21	13,5	R	17	R	20	21	R
E₁₄	CMI (197)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (98,5)	19	R	21	12	R	15	R	14	23	R
P₅₀	Solution à 15% d'HE (14775)	<i>TIC</i>	<i>TCC</i>	<i>CAZ</i>	<i>PIP</i>	<i>OFX</i>	<i>CIP</i>	<i>AN</i>	<i>GM</i>	<i>FOS</i>	<i>C</i>
		R	R	12	14,5	R	19	13,5	R	11	R
P₅₂	Solution à 15% d'HE (14775)	R	R	R	12	R	14	11	R	R	R
A₁	CMI (281,42)	<i>TIC</i>	<i>TCC</i>	<i>OFX</i>	<i>AN</i>	<i>GM</i>	<i>FOS</i>	<i>C</i>	<i>STX</i>	<i>TE</i>	<i>RA</i>
	Demi CMI (140,71)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
A₂	CMI (289,70)	<i>Pas de croissance du germe</i>									
	Demi CMI (144,85)	8	R	16,5	12	R	15	R	R	R	R

D'après ce tableau, on observe une absence de croissance de toutes les souches d'Entérobactéries et d'*Acinetobacter* lors incorporation d'HE dans la gélose avec leurs CMI.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibitions par les antibiotiques de ce test de combinaison avec la demi CMI d'HE par rapport à ceux obtenus dans l'antibiogrammes normales de ces souches (voir annexes: Tableaux N°27; 28; 29) ne montre aucun changement au niveau de résistance de ces souches.

Les souches *Pseudomonas* se révèlent multirésistantes.

4-2- Combinaisons : Huile essentielle – Huile essentielle:

Selon le Tableau N°13, on observe que la combinaison entre les deux huiles essentielles (HE de *Thymus capitatus* + HE de *Ammoides verticillata*) donne une meilleure activité antibactérienne sur la majorité des Entérobactéries surtout vis-à-vis les souches *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* avec une moyenne des diamètres respectivement 38,66 mm et 37,33 mm.

Pour les *Acinetobacter*, cette combinaison à une même activité presque que l'effet de l'huile essentielle *Thymus capitatus* toute seule soit une moyenne de diamètre 40 mm.

La combinaison entre ces deux huiles essentielles est sans aucun effet sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Donc; malheureusement on détecte toujours la forte résistance de ces souches.

Tableau N°13: Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (en mm) du test de combinaisons " Huile essentielle – Huile essentielle":

<i>Souches</i> \ <i>Combinaison</i>	<i>HE de Thymus capitatus + HE de Ammoides verticillata</i>
<i>K4</i>	38,67
<i>K5</i>	36
<i>En12</i>	34,67
<i>En17</i>	33,33
<i>E9</i>	39
<i>E14</i>	38,33
<i>P50</i>	<i>R</i>
<i>P52</i>	<i>R</i>
<i>A1</i>	39,67
<i>A2</i>	40,33

Discussion

Même si les SARM restent le principal problème en terme de BMR, dans la plupart des pays européens (Voss et al. 1994), le problème de la résistance des bacilles à Gram négatif aux céphalosporines de troisième génération est également préoccupant (Hanberger et al. 1999).

Sur 123 prélèvements analysés dans notre étude, 112 prélèvements ont été positifs soit 91,05%.

L'interprétation des résultats obtenus à partir de ces prélèvements montre une nette prédominance des entérobactéries isolées dans le portage digestif soit 68,75%, suivi les *Pseudomonas* (28,57%). Et l'inverse chez les patients intubés où les bacilles pyocyaniques occupent la première place (67,39%).

Ces taux retrouvés sont supérieurs à ceux retrouvés dans une étude française en 2005 réalisée sur 1689 prélèvements chez les patients intubés où la fréquence des *Pseudomonas* isolées était 52,58%, suivi les Entérobactéries avec 30% (Girault et al. 2005), mais ces taux se rapprochent de ceux retrouvés par d'autres études (Richards et al. 1999 ; Chastre et Fagon. 2002 ; Chastre et al. 2003).

Parmi les entérobactéries isolées de la flore digestive, les *Klebsiella sp* étaient au premier rang soit 42,85%; suivi des *Enterobacter sp* (35,06%) et de *E. coli* (16,88%). Ces résultats obtenus diffèrent de ceux retrouvés en 2004; où les *Enterobacter sp* et *E. coli* qui prédominent avec des taux respectivement de l'ordre de 40,5% et 18,8% (C-clin Ouest. 2004).

Les *Acinetobacter sp* arrivent en 3^{ème} position avec l'isolement de trois souches pour chaque site.

Les résultats de l'activité antibactérienne de 18 antibiotiques testés sur les entérobactéries montrent un taux de résistance considérable aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et leurs associations avec l'acide clavulanique surtout chez *Enterobacter sp* où le taux de résistance à l'amoxicilline protégée est de 75%. Ces résultats sont similaires d'une étude tunisienne dont la résistance des *Enterobacter sp* aux AMC est de l'ordre de 77,2% (Nazih et al. 1998), par contre cette fréquence reste inférieure à celle retrouvée dans l'enquête française en 2004, où 99,7% de souches sont résistantes (C-clin Ouest. 2004).

En ce qui concerne les céphalosporines de première génération, on constate que la résistance était de 80% chez *E. coli*, de 90% chez *Klebsiella sp* et de 82,14% chez *Enterobacter sp*. Un niveau de résistance plus important a été constaté avec toutes les souches, ces mêmes résultats ont été obtenus dans les différentes enquêtes de C.CLIN réalisés en France (C-clin Sud-Ouest. 2001; C-clin Ouest. 2004; C-clin Est. 2006).

La résistance de *E. coli* aux céphalosporines de troisième génération est remarquable, alors qu'elle augmente considérablement dans le cas de *Klebsiella sp* et *Enterobacter sp* surtout à céfotaxime où le taux de résistance soit supérieur à 60%. Ces résultats sont différents d'une enquête française où le taux

de résistance aux céphalosporines CTX est de l'ordre de 45%, donc une diminution de résistance (C-Clin Ouest. 2004).

Par ailleurs, cette fréquence reste supérieure à celle retrouvée par une étude tunisienne de **Ben Redjeb et al** en 2000 avec globalement 23,6% de souches résistantes. En revanche, les taux de résistance restent les mêmes à ceux retrouvés dans certaines études tunisiennes et de Nord du Liban (63,1%) (**Hamze et Izard. 1997 ; Nazih et al. 1998**).

La forte résistance aux pénicillines chez les Entérobactéries est due à la sécrétion des B-lactamases plasmidiques de type pénicillinases surtout à *E coli* (**Sanders et Sanders. 1992**). Pour les *Klebsiella sp*, la résistance aux aminopénicillines est liée aussi à la perméabilité.

Pour ce qui est concerne la résistance aux céphalosporines de 1^{ère} génération ainsi que la résistance à l'AMC, elles sont en général directement liées à une hydrolyse enzymatique par le biais de B-lactamase de type céphalosporinase chromosomique. Celles-ci ont été retrouvées et bien caractérisées chez *E coli* (**Fosberry et al. 1994; Bauernfeind et al. 1996 ; Sougakoff et Trystram. 2003**).

La résistance élevée aux céphalosporines de 3^{ème} génération peut être liées:

- Souvent à une production de B-lactamase à spectre étendu à médiation plasmidique. Dans ce cas, en raison de leur capacité d'hydrolyser les céphalosporines de 3^{ème} génération et de leur support génétique extrachromosomique ainsi que leur grande diversité, ces nouvelles pénicillinases peuvent constituer une véritable menace pour l'efficacité thérapeutique des nouvelles céphalosporines à large spectre (**Hibbert-Rogers et al. 1994 ; Soilleux et al. 1996 ; Arlet et al. 1997; Bermudes et al. 1997**).
- Soit à une hyperproduction de céphalosporinase, ce phénomène de résistance est observé surtout chez les genres d'*Enterobacter* qu'il est due principalement au phénomène de séquestration ou "non trapping", résultant d'une hyperproduction d'AmpC suit à une dérégulation de l'expression de sa synthèse ; c'est-à-dire le passage de l'état constitutif à haute niveau (**Korfmann et al. 1991 ; Ramadan et al. 1995**).

Notre étude montre une bonne sensibilité de souches Entérobactéries aux aminosides en présence de l'amikacine, soit 8% de souches sont résistantes; contrairement à la gentamicine où elle reste inactive sur la moitié de souches. Contrairement à ce qui est observé en France, où l'incidence d'apparition des résistances aux aminosides a augmenté ces dernières années, plus de 82% de souches ont été résistantes à la gentamicine (**EARSS. 2003**).

La diffusion d'enzymes inactivatrices est la cause de cet accroissement. Cela explique que les pourcentages de résistance des différentes souches varient selon les continents, les pays et les hôpitaux

(**Dornbusch et al. 1990**). Il existe une corrélation significative entre l'apparition de mutants résistants et l'usage des aminosides (**Gerding et al. 1991**).

L'augmentation du pourcentage de souches d'entérobactéries résistantes à la gentamycine et à l'amikacine va de paire avec l'accroissement de l'utilisation de ces antibiotiques (**Dornbusch et al. 1990**).

Parmi les quinolones, l'ofloxacin a une faible activité sur la majorité de souches d'entérobactéries surtout chez *Enterobacter sp* et *E. coli* avec un taux de résistance 60%. Les ciprofloxacine conservent une activité appréciable chez la plupart des espèces. De nombreuses études ont rapporté l'ampleur du problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Liassine. 2000**).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie saprophyte que l'on retrouve de plus en plus dans les surinfections hospitalières et qui est responsable de nombreux décès chez les immunodéprimés (**Govan. 1995**).

Un niveau de résistance très important de souches *Pseudomonas sp* isolées à partir des sondes d'intubations que le portage digestif vis-à-vis l'antibiotique ticarcilline, soit 96,77% de souches résistantes isolées de patients intubés. On observe le même niveau de résistance de cet antibiotique en association avec l'acide clavulanique soit un taux 90,32% de souches résistantes.

Le principal mécanisme incriminé dans le cas de la résistance à la ticarcilline (phénotype résistante R ou intermédiaire I), est la production de pénicillinase. En effet à Tunis, la production de B-lactamases est observée chez 22,3% des souches isolées à l'hôpital Charles Nicolle et particulièrement de type pénicillinase (**Ben redjeb et al. 2000**). Les souches de ce phénotype demeurent sensibles à la ceftazidime (**Thabaut at al. 1984 ; Thabalit et al. 1989**). Un autre mécanisme peut être envisagé, est l'imperméabilité de la paroi fortement suspectée en raison de la multirésistance des souches (**Karray et al. 1993**).

Pseudomonas sp présente une résistance naturelle aux céphalosporines par production d'une céphalosporinase inductible (**Philippon et al. 1984 ; Thabaut at al. 1984**). Cependant, la ceftazidime et la pépiracilline restent très actives sur les souches de *Pseudomonas sp*. Les taux de résistance à ces deux antibiotiques sont respectivement de l'ordre de 27% et 35%. Une étude réalisée par **Cavallo et al.** en **2003**, montre que la résistance à la ceftazidime soit 35%, et 27% à la pépiracilline.

En effet, l'activité des céphalosporinases est conditionnée à la fois par leur stabilité à l'égard des B-lactamases du bacille pyocyanique et par une meilleure pénétration à travers la membrane externe (**Duval et Soussy. 1984**).

La ceftazidime et la pépiracilline sont des antibiotiques qui peuvent facilement pénétrer par les porines, c'est ce qui explique la fr equance assez élevée des souches sensibles à ces deux antibiotiques. En dehors de la résistance enzymatique par la production de pénicillinase et ou céphalosporinase d er eprim ee, d'autres mécanismes de résistance non plasmidiques telles que la diminution de la perméabilité membranaire et l'altération de la cible d'antibiotique, sont suspectées en raison de la multirésistance de nos souches. Ce type de résistance a été observ e par **Karray et al. 1993**, sur des souches isolées au CHU de Sfax.

La résistance à l'imipénème s'observait seulement chez 3 souches (soit 4,76%), ces chiffres sont inférieurs à ceux retrouv es dans d'autres études; dont 12-17% de souches étaient résistantes à l'IPM (**Cavallo et al. 1997 ; GERPB. 2004**).

Les aminosides constituent le deuxième groupe de composés r eput es actifs sur *Pseudomonas sp.* Ils sont plus bactéricides que les B-lactamines.

La tobramycine est la plus efficace (88,89% de souches sont sensibles). L'amikacine arrive en deuxième position avec 80,95% des souches sensibles, suivie de la gentamicine (57,14% de souches sensibles). Les mêmes résultats ont été trouv es par **Kamoun et al. 1990**, sur 1020 souches isolées à Tunis où 25,4% de souches résistantes à la tobramycine suivi de l'amikacine (32,3%) puis de la gentamicine (58,4%).

Selon l'étude faite par **Karray et al. 1993**, sur 213 souches isolées au centre hospitalo-universitaire de Sfax, l'amikacine avait la meilleure activité suivie de la tobramycine et la gentamicine.

D'après des études effectuées en France et en Espagne, ils ont trouv es les mêmes résultats où la gentamicine occupe toujours la troisième place. Et la tobramycine restes l'aminoside le plus efficace ainsi que l'amikacine, soit 86% de souches sensibles (**Ojeda-Vargas et al. 1995 ; GERPB. 2004**).

Cette résistance aux aminosides est associée à la modification de la membrane externe (**Galbraith et al. 1984**).

La forte résistance à triméthoprime-sulfamide (96,8%) est due à une mutation chromosomique ou à l'acquisition d'un plasmide de résistance (transposon) (**Shapiro et Sporn. 1977**).

Les bactéries productrices de B-lactamase à spectre étendu (BPBLSE) sont responsables d'épidémies d'infections nosocomiales en particulier dans les services de réanimation (**Branger et al. 1998 ; Decré et al. 2000**).

Lors de notre étude, nous avons not es une forte proportion de EBLSE au cours de cette année 2006. 20,45% de patients ont été colonis es ou infect es par ces germes, cette fr equance est relativement

faible par rapport à celle retrouvée par une étude réalisée en France menée en 2001 (soit 35% à 40%) (**Jarlier. 2001**).

Parmi les 20 souches isolées, l'espèce productrice de BLSE prépondérante est *Klebsiella pneumoniae* avec une fréquence de 65%, comme les résultats des études réalisées précédemment par **Bingen et al. 1993 ; Gouby et al. 1994 ; Lucet et al. 1996**.

Ce résultat est différent de ceux retrouvés par une enquête française (**Eveillard et al. 2001**), qui révèle une prédominance d'*Enterobacter aerogenes* avec 77,3% ; ainsi que dans une étude réalisé par **Moragny en 2002** avec un taux de 62%.

Une étude réalisée sur la résistance des bacilles à Gram négatif isolés dans les unités de réanimation a montré que la proportion de souches *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE était beaucoup plus élevée en France (36%) qu'en Belgique (13%), Pays-Bas (12%) et Allemagne (5%) (**Jarlier et al. 1996**).

Les souches d'EBLSE (principalement *K. pneumoniae*, mais aussi *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) sont résistantes à l'ensemble des B-lactamines (sauf les céphamycines et l'imipénème), aux aminosides et très souvent aux fluoroquinolones (**Fourmaux et al. 1994**).

La dissémination de ce phénotype de résistance peut être liée à la diffusion de plasmides (**Decré et al. 2000**). Pour cela, on fait l'analyse du contenu plasmidique.

C'est une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose, rapide qui a été précédemment utilisée lors des études épidémiologiques des BPBLSE (**Decré et al. 1998**).

Cette analyse du contenu plasmidique de cinq souches d'Entérobactéries productrices de BLSE isolées dans notre étude, a montré que les trois souches de *Klebsiella pneumoniae* avaient montré des plasmides avec 4 profils différents. Et trois profils plasmidiques différents ont été observés chez les souches *Enterobacter cloacae*. La fréquence trouvée pour les *Klebsiella pneumoniae* est le même de celle observée par l'étude de **Moustaoui et al. 2002**, où il trouve quatre profils différents.

Ces cinq souches d'Entérobactéries productrices de BLSE hébergent le même plasmide aux souches transconjugantes avec un poids moléculaire de 60 kb, c'est-à-dire le phénotype BLSE isolées en réanimation serait issu d'un même plasmide.

Dans notre étude, contrairement aux souches de *Klebsiella pneumoniae* et celles de *Enterobacter cloacae*, les deux souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont montré des difficultés à transfère leurs plasmides dans le test du conjugaison.

Cette différence peut être attribuée à la présence des plasmides de structure différente liée à leur grande taille, ce qui explique probablement la difficulté de leur transfert.

En effet, des études ont montré la difficulté à extraire et à transférer les plasmides chez le genre *E. coli* (El Solh et al. 1986), ainsi que chez d'autres genres bactériens (Pidcock et al. 1997). L'analyse du contenu plasmidique est un marqueur épidémiologique intéressant dans l'exploration des infections nosocomiales.

Pour le germe *Acinetobacter baumannii* (Ab), de nombreuses épidémies ont été décrites, le plus souvent en réanimation (Villegas et Hartstein. 2003).

Dans notre étude, parmi les 6 souches isolées d'*Acinetobacter baumannii* ; cinq souches ont été résistantes à la ticarcilline et à son association avec l'acide clavulanique (TCC).

Les céphalosporines de 3^{ème} génération (ceftazidime) et les uréidopénicilline (pépiracilline) restent actifs sur cinq souches. Donc, seulement une souche résistante soit 16,67%. La résistance à céfazidime est due généralement à la production de *B*-lactamase à spectre étendu (BLSE) de type VEB-1. Le même taux de résistance est obtenu par Poirel et al en 2003.

L'étude de l'évolution de la résistance à l'imipénème de ce germe montre que toutes les souches isolées ont été sensibles soit 100%. Ces chiffres sont similaires d'une étude française réalisée sur 138 souches d'*Acinetobacter baumannii* et dont toutes les souches isolées étaient sensibles à l'IMP soit un taux de 100% (Roussel-Delvallez. 2004).

La résistance aux aminosides est remarquable, dont 66,67% de souches sont résistantes à la gentamicine et 33,33% à l'amikacine. Cette fréquence est élevée par rapport à celle retrouvée par l'enquête française menée en 2004 où 18,2% de souches résistantes à l'amikacine (C-Clin Ouest. 2004).

Pour les autres antibiotiques, l'*Acinetobacter baumannii* est naturellement résistant à la fosfomycine, triméthoprime, furanes. Pour cela, on révèle un taux de résistance élevé vis-à-vis ces antibiotiques.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* responsables d'épidémies nosocomiales sont souvent multirésistantes, réduisant le nombre d'antibiotiques utilisables notamment pour l'antibiothérapie probabiliste (Kaul et al. 1996).

L'action bactériostatique des huiles essentielles pures de *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* par la technique de Vincent se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques.

Les huiles essentielles de *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* témoignent d'une activité bactérienne intéressante contre la majorité de souches testées sauf pour les germes *Pseudomonas*. En effet, *Klebsiella pneumoniae*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à ces deux huiles.

Selon **Pellecuer et al. 1980**, et en l'absence de toutes normes officielles de référence en matière d'interprétation de ce test ; on peut néanmoins subjectivement et par analogie avec celles établies pour l'antibiogramme courant établir l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles vis-à-vis les différentes souches testées.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* paraît moins active par rapport à de *Thymus capitatus*. Dont on observe que les diamètres d'inhibitions de souches entérobactéries et *Acinetobacter sp* par l'huile essentielle de *Thymus capitatus* est de 28 mm à 39 mm, contrairement à 2^{ème} huile où on trouve les diamètres entre 17 mm et 32 mm. On note aussi que les deux huiles sont inactives face aux souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Sauf que l'huile de *Thymus capitatus* donne une petite zone d'inhibition soit 14,83 mm contre la souche *Pseudomonas P₅₀*. (Mais la souche reste résistante).

Ces résultats de l'activité antibactérienne par l'huile *Thymus capitatus* sont mieux par rapport à ceux retrouvés par l'étude algérienne de **Senouci-Bereksi et Abdelouahid** menée en **2005**, surtout contre les germes *Klebsiella pneumoniae* où le diamètre moyen d'inhibition dans cette étude est de l'ordre 20,96 mm et dans notre travail on a trouvé une zone d'inhibition de 31,165 mm.

Par ailleurs, les résultats de l'activité antibactérienne de cette huile contre les germes *Pseudomonas aeruginosa* restent semblables à ceux retrouvés par l'étude marocaine de **Bouhdid et al** en **2006** dont ces germes restent toujours résistants.

Pour l'huile essentielle *Ammoides verticillata* de notre étude, elle est aussi inactive contre les souches *Pseudomonas aeruginosa* comme l'huile *Thymus capitatus*. Par contre ce résultat est différent d'une étude antérieure où il est trouvé une zone d'inhibition assez important, soit un diamètre d'inhibition 20,8 mm (**Bekhechi et Abdelouahid. 2002**).

L'importante d'action antibactérienne démontrée par Les huiles essentielles de *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* peut être reliée à la présence du carvacrol et du thymol qui sont majoritaires dans ces deux huiles. Ces deux composés phénoliques sont en effet connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (**Laouer et al. 1998 ; Ettayebi et al. 1999 ; Ultee et al. 2000**).

Plusieurs études ont montré que le carvacrol présente plusieurs activités biologiques (**Duke. 1998**) : il est anthelminthique, antibactérien, antidiurétique, anti-inflammatoire, antioxydant, antiseptique, antipasmodique, antitussif, expectorant, carminative, fongicide, irritant, pesticide et vermifuge.

Un test de contact direct est appliqué seulement sur l'huile essentielle *Thymus capitatus* vis-à-vis les souches testées puisqu'elle donne une activité antibactérienne intéressante que celle avec L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

Les résultats de ce test montre que les souches d'Entérobactéries: *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle *Thymus capitatus* avec des dilutions inférieures à 1/30 (soit <328,33 µg/ml). Donc leurs croissances sont absentes même dans la solution mère et les autres dilutions 1/10 et 1/20. Alors que les souches *E.coli* sont sensibles à des dilutions inférieures ou égales à 1/50 (soit ≤197 µg/ml)

Pour les *Acinetobacter baumannii*, on révèle une sensibilité importante à partir des dilutions inférieures à 1/40 (soit < 246,25 µg/ml).

Contrairement aux germes *Pseudomonas aeruginosa*, où on observe leurs croissances dans la solution mère et même dans la solution à 15% d'huile essentielle.

L'analyse des concentrations minimales inhibant la croissance de ces germes par l'huile essentielle de *Thymus capitatus* révèle la résistance des *Enterobacter cloacae* parmi les Entérobactéries et qui sont inhibées par cette huile à des CMI; *En*₁₇: 469,047µg/ml et *En*₁₂: 447,727µg/ml. Suivie les *Klebsiella pneumoniae* avec des CMI moyennes; *K*₅: 428,26µg/ml et *K*₄: 378,84µg/ml.

Les souches *E.coli* sont sensibles à des CMI très faible parmi l'ensemble de souches testées, soit *E*₉: 205,208µg/ml et *E*₁₄: 197µg/ml. Les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont aussi sensibles à des concentrations minimales inhibitrices assez faibles soit *A*₂: 289,70µg/ml et *A*₁: 281,42µg/ml

Par contre, les souches de *P. aeruginosa* montrent très résistantes, comme les résultats précédentes du test de contact direct. Donc ces souches peuvent croître même à des concentrations d'HE supérieure à 14775µg/ml.

Ces résultats se rapprochent de ceux retrouvés dans une étude antérieure où les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont inhibées à des concentrations minimales entre 493,736µg/ml et 407,869µg/ml. Ainsi la résistance des germes *Pseudomonas aeruginosa* même à des concentrations en huiles essentielles supérieures à 14071µg/ml (Senouci-Bereksi et Abdelouahid. 2005).

La résistance de souches *P. aeruginosa* aux huiles testées n'est pas surprenante. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (Mann et al. 2000).

Le test de combinaison "Huile essentielle – Antibiotiques" montre l'absence de croissance de toutes les souches d'Entérobactéries et d'*Acinetobacter* lors incorporation d'huiles essentielle de *Thymus capitatus* dans la gélose de Mueller Hinton à des concentrations CMI.

Par contre, à la présence des concentrations de demi CMI ; on observe des résultats similaires à ceux retrouvés dans l'antibiogramme.

De même, cette combinaison est sans aucun effet sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* ; elles restent résistantes.

Par ailleurs à ces résultats, l'essai de combinaison d'huile essentielle de *Thymus capitatus* avec l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* donne une meilleurs résultats d'activité antibactérienne sur la majorité des Entérobactéries surtout vis-à-vis les souches *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* où on révèle une sensibilité très importante avec une moyenne des diamètres d'inhibitions respectivement 38,665 mm et 37,33 mm. Ainsi les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont sensibles avec une moyenne de diamètre 40 mm. On note que les germes *Pseudomonas aeruginosa* restent résistants par cette combinaison.

Conclusion

L'analyse du contenu plasmidique est un marqueur épidémiologique intéressant dans l'exploration des infections nosocomiales, mais elle est limitée par l'instabilité et les difficultés à extraire certains plasmides. C'est pourquoi, il est nécessaire de faire appel à d'autres méthodes génotypiques très intéressantes telles:

- **ECP** (Electrophorèse en champ pulsé), s'est avérée, méthode excellente pour le typage des BPBLSE.
- **PCR** (polymerase chain reaction), qui permet de distinguer les fragments des gènes codant pour les BLSE.

Pour le pouvoir antimicrobien des huiles testées, cette étude montre que les deux huiles essentielles de *Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata* témoignent d'activités antibactériennes intéressantes in vitro. Cependant, il faut signaler que l'huile essentielle de *Thymus capitatus* révèle une meilleure activité biologique contre la majorité de souches d'Entérobactéries et *Acinetobacter* testées.

En effet, les souches *Pseudomonas aeruginosa* montrent une résistance élevée, même à des concentrations d'HE de *Thymus capitatus* supérieure à 14775µg/ml. Par contre, les autres souches sont plus sensibles dont les Entérobactéries sont inhibées avec une moyenne des CMI suivantes: *Enterobacter cloacae*: 458,387µg/ml ; *Klebsiella pneumoniae*: 403,55µg/ml ; *E. coli*: 207,104µg/ml. Pour les *Acinetobacter baumannii*, ces souches sont inhibées à des CMI variant entre 289,70µg/ml et 281,42µg/ml.

L'essai du combinaison entre les deux huiles (*Thymus capitatus* et *Ammoides verticillata*) révèle une augmentation au niveau de sensibilité de souches d'Entérobactéries et *Acinetobacter* testées.

A sensibilité des souches médicales, même celles multirésistantes aux antibiotiques (Entérobactéries et *Acinetobacter*), à l'huile de *Thymus capitatus* suggère sa possible utilisation en thérapeutique comme alternative naturelle aux agents chimiothérapeutiques dont le spectre d'action est en réduction continue.

Bien sûrs ces résultats obtenus in vitro ne constituent qu'une première étape de recherche de produits antimicrobiens nouveaux et naturels à proposer en médecine. Des études complémentaires devant pouvoir nécessaires vis-à-vis l'huile essentielle de *Thymus capitatus*:

- Une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse pour déterminer la composition chimique de cette huile essentielle.
- une étude détaillée sur les activités biologiques à l'ensemble des composées contenant dans cette huile.

- De même, il est intéressant de voir l'effet de cette huile sur les Staphylocoques résistants à la méticilline (SAMR); ainsi que d'autres germes pathogènes.
- Des tests de toxicité primaire cutanée et des tests d'allergénicité pour connaître la toxicité de ces huiles essentielles.
- Des études sont nécessaires pour évaluer in vivo de cette huile essentielle sur des modèles animaux.

L'émergence de nombreuses souches productrices de BLSE dans notre étude, nous amène aussi à réfléchir sur les moyens de prévention contre les infections nosocomiales (**Liassine. 2000; Goldman et al. 1996**).

Les mesures unanimement reconnues sont (**Mirabaud. 2003**):

- L'isolement des personnes colonisées ou infectées, qui permet l'application facilitée de mesures d'hygiène strictes en raison de la localisation des personnes malades dans une zone bien délimitée.
- Le lavage systématique des mains du personnel.
- L'élimination des déchets contaminés par des voies sécurisées.

Ces mesures sont bien évidemment à appliquer rigoureusement afin d'optimiser les chances de réussite.

En conclusion, il est actuellement impératif pour freiner le développement des résistances et maîtriser les coûts de santé de changer nos comportements, et ne prescrire les antibiotiques que si nécessaire et de façon raisonnée. Cela doit passer par une éducation des patients, la formation et la sensibilisation des prescripteurs, l'application des procédures d'hygiène, et la mise en place d'un réseau de surveillance des résistances bactériennes. Ce n'est qu'à travers les efforts consentis par les différents acteurs que la recrudescence actuelle de la multirésistance bactérienne peut être maîtrisée. Ainsi, il serait possible de maintenir ou prolonger l'efficacité des antibiotiques existants.

*Références
Bibliographiques*

- **Abraham E. P, et Chain E. 1940.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837.
- **Ambler R. P. 1980.** The structure of B-lactamases. *Phil. Trans R. Soc. Lond. Biol Sci.* 289: 321-331.
- **Ambler R. P., Coulson A. F. W., Frère J. M., Ghuysen J. M., Joris B., et al. 1991.** A standard numbering scheme for the class A B-lactamases. *Biochem. J.* 276: 269-270.
- **Ames G. R. et Mathiew V. S. A. 1968.** The Distillation of Essential Oils, Tropical Products Institutes, 10(1), 136-149.
- **Amyes S. G; Gemmeli. C. G. 1992.** Antibiotic resistance in bacteria. *S. Med. Microbiol.* 36: 4-29.
- **Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B. 2003.** Current Epidemiology of Septic Shock: The CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*; 168: 165-72.
- **Araj G. F, Kanj S. A. 2000.** Current status and changing trends of antimicrobial resistance in Lebanon. *Leb Med J*; 48: 221-226.
- **Arlet G., Brami G., Dècrère D., Flippo A., Galtolot O., Lagrange P. H, Philippon A. 1995.** Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM B-lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 1498-1500.
- **Arlet G, Rouveau M, Philippon A. 1997.** Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum B-lactamase. *FEMS Microbiol Lett*; 152:163-7.
- **Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P. 1993.** Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol.* 175 (1): 117-127.
- **Ausloos B. 2002.** Phytothérapie. Utilisation et propriétés de la phytothérapie. Bruxelles. 287-295.
- **Bamba D., Bessière J. M., Marion C., Pélissier Y., Fouraste I. 1993.** Essential oil of *Eupatorium odoratum*. *Planta Medica*, 59(2): 184 -185.
- **Bandoh K, Muto Y., Watanabe K., Katoh N., Ueno K. 1991.** Biochemical properties and purification of metallo-B-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(2): 371-372.
- **Banquour N. 1984.** Etude de l'effet de thym (décoction) et son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du smen au cours de son évolution. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle en microbiologie. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Marrakech.
- **Barrial K., Scotet J. 2006.** Classification raisonnée des B-lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud. S, de bactériologie.* 3-10.
- **Baudoux D. 2000.** L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. Edition Atlantica.

- **Bauernfeind A., Stemplinger I., Jungwirth R., Ernst S., Casellas J. M. 1996.** Sequences of beta-lactamase genes encoding ctx-m-1 (men-1) and ctx-m-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 509-513.
- **Bekhechi B. C., Abdelouahid D. E. 2005.** Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Nûkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister. Institut de Biologie. Faculté des sciences. Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. Algérie.
- **Belaïche P. 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine S.A, Tome 1.
- **Bellakhdar J. 1997.** La pharmacopée Marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press. Paris, 1997.
- **Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M., Ayadi A. 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome XX, n° 2, p. 155-167.
- **Benmerabet K., Abed L. 1982.** Quelques aspects de la pharmacopée traditionnelle Algérienne. *Le pharmacien du Maghreb*, spécial N°2.
- **Ben Redjeb S., Ben Hassen A., Hammami A., Kechrid A. 2000.** Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie. "Résistance aux antibiotiques". *Press. Méd.* 1-5.
- **Bermudes H., Arpin C., Jude F., Elharrif Z., Bebear C., Quentin C. 1997.** Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteria* in a French hospital. *Klebsiella pneumoniae* Resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 523-529.
- **Beylier-Maurel M. F. 1976.** Activité bactériostatique de certaines matières premières de parfumerie, *Rivista Italiana E.P.P.O.S.*, 58 : 283-286.
- **Billot-Klein D., Gutmann L., Collatz E. 1990.** Nucleotide sequence of the SHV-5 B-lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*. 34(12): 2439-2441.
- **Bingen E. H., Desjardins P., Arlet G., et al. 1993.** Molecular epidemiology of plasmid spread among extended-broad-spectrum B-lactamase producing *K. pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J Clin Microbiol*; 31: 179 -184.
- **Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G. 1993.** Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Sicilian Aromatic Plants. *Flav. Fragr. J*, 8, 331- 337.
- **Bonnet R., Sampaio J. L. M., Labia R., Champs C. D., Sirot D., Chanel C., Sirot J. 2000.** A novel CTX-M B-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44: 1936-1942.
- **Borsotto S., Assone S., 2001.** Il *Thymus*, un genere di interessante impiego in ambito urbano. *Colture Protette* 9:147-151.

- **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N. S., Abrini J. 2006.** Thymus essential oils. Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substance Natural.*324-326.
- **Bradford P. A., Yang Y., Sahn D., Grope I., Gardovska D., Storch G. 1998.** CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1980-1894.
- **Bradford P. A. 1999.** Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla_{SHV}* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2960-2963.
- **Bradley S. F. 1999.** Issues in the management of resistant bacteria in long term care facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 20: 362-6.
- **Branger C., Lesimple A. L., Bruneu B., Berry P., Lambert-Zechovsky N. 1998.** Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum B-lactamases in a university hospital. *J. Med. Microbiol.* 47: 210-209.
- **Brun-Buisson C, Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., Duval J. 1987.** Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporin's during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1 (2): 302-306.
- **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. 3^{ème} Ed: Tec et Doc. Lavoisier. Paris.
- **Brunke E. J. 1985.** Progress in essential oil. Proceeding of the international symposium on essential oil. Federal republic of Germany. 53.
- **Bush K. 1989.** Characterization of B-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(3): 259-263.
- **Bush K., Singer S. B. 1989.** Biochemical characteristics of extended broad spectrum B-lactamases. *Infection* 17: 429-433.
- **Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1995.** A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(6): 1211-1233.
- **CA-SFM. 2005.** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. "Communiqué 2005". Document disponible sur <http://www.sfm.asso.fr>
- **Cassella S., Cassella J. P., Smith I. 2002.** Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection, *The International Journal of Aromatherapy*, Vol 12: 2-15.
- **Casewell M. W., Phillips I. 1977.** Hands as a route of transmission for *Klebsiella* species, *Br. Med. J.*1315–1317.
- **Cavallo J.D., Gerome P. Fabra R. 1997.** *P. aeruginosa* en 1997. *Feuillets de Biologie.* XXXVI (I): 11-22.

- **Cavallo J. D., Fabre R., Garrabé E., GREPB. 2003.** Quelle bêta-lactamines utiliser comme marqueur de multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Résistance aux antibiotiques. Pathologie Biologie. Ed Elsevier (51). 460-463.
- **C-clin Sud-Ouest. 2001.** Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections nosocomiales. Surveillance des bactéries multirésistantes à partir des laboratoires de microbiologie. France.
- **C-clin Ouest. 2004.** Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections nosocomiales. Résultats de la surveillance des bactéries multirésistantes Année 2004. Inter région Ouest. C.H.U. de Rennes "Pontchaillou". 19-37.
- **C-clin Est. 2006.** Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections nosocomiales de l'Est. Protocole de surveillance des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Réseau de surveillance des bactéries multirésistantes BMR 2006. France.
- **Chastre J., Fagon J. Y. 2002.** Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med; 165: 867-903.
- **Chastre J., Wolff M., Fagon J. Y., Chevret S., Thomas F., et al. 2003.** Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial. JAMA; 290: 2588-2598.
- **Chevreul. 1819.** Article huiles, in F. Cuvier, Dictionnaire des sciences naturelles, Levrault, T. XXI, 517.
- **Chow J. W., Fine M. J., Shlaes D. M., Quinn J. P., et al. 1991.** *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann Intern Med; 115(8): 585-590.
- **Chowdhury A. R. 2002.** Essential oils of the leaves of *Eupatorium odoratum* L. from Shillong (N.E.). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 5(1): 14-18.
- **Christensen J. J., Keiding J., Brun B. 1990.** Antimicrobial susceptibility and B-lactamase characterization of *Branhamella catarrhalis* isolates form 1983/1984 and 1988. APMIS (98): 1039-1044.
- **Christensen J. J., Keiding J., Schumacher J., Brun B. 1991.** Recognition of a new *Branhamella catarrhalis* B-lactamase - BRO-3. J. Antimicrob. Chemother. (28): 774-775.
- **Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A. J. 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethno-pharmacology, 79(2): 213 - 220.
- **Cohen S. P., McMurry L. M., Levy S. B. 1988.** marA locus causes decreased expression of OmpF ponn in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* . J Bacteriol. 170(12): 5416-5422.

- Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. 1985. L'antibiogramme. Edi: MPC/Vigot. 225-236.
- Datta N., Knotomichalou P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature 208: 239-241.
- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science; 264: 375-393.
- Dbaibo G. S. 2000. Old and new targets of antibacterial therapy. Leb Med J; 48: 177-181.
- Dechamps C., Sirot D., Chanal C., Poupart M. C., Dumas M. P., Sirot J. 1991. Concomitant dissemination of three extended-spectrum B-lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. J Antimicrob Chemother; 27 (4): 441-457.
- Decré D., Gachot B., Lucet J. C, Arlet G., Bergone-Bérézin E., Régnier B. 1998. Clinical and bacteriological epidemiology of extended-spectrum B-lactamase-producing strains of *K. pneumoniae* in medical intensive care unit. Clin Infect Dis; 27: 834-844.
- Decré D., Gachot B., Lucet J. C., et al. 2000. Epidémiologie Moléculaire. 320: 31-39.
- Demerec M. 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics: J. Bacteriol 56: 63-74.
- Dornbusch K, Miller GH, Hare RS, Shaw HJ, and the escar study group. 1990. Resistance to aminoglycoside antibiotics in Gram-negative bacilli and Staphylococci isolated from blood. Report from a European collaborative study. J Antimicrob Chemother; 26; 131-44.
- Duke J. A. 1998. Phytochemical Database. USDA-ARS-NGRL (Ed), Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.
- Duval J., Soussy C.J., 1984. Evolution et état actuel de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques. Presse Médicale.13: 763-767.
- Dworzack D. L., Pugsley M. P., Sanders C. C., Horowitz E. A. 1987. Emergence of resistance in gram-negative bacteria during therapy with expanded-spectrum cephalosporins. Eur J Clin Microbiol. 1987 Aug; 6(4): 456-459.
- EARSS. 2003. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual report 2003. Ongoing surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*. Bilthoven, the Netherlands, RIVM.
- El Solh N., Allignet J., Bismuth R., et al. 1986. Antimicrob Agents Chemother; 38 (1): 161-169.
- Elwell L. P; Fling M. E. 1989. Resistance to trimethoprim. In L.E. Bryan (ed.), Microbial resistance to drugs. Springer-Verlag, Berlin.
- Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D. 1999. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*, FEMS Microbiology Letters, 183: 191-195.

- **Eveillard M., Biendo M, Canarelli B, Daoudi F, Laurans G, Rousseau F, Thomas D, Eb F. 2001.** Diffusion des entérobactéries productrices de B-lactamases à spectre élargi et évolution de leur incidence sur une période de 16 mois dans un centre hospitalier universitaire. *Pathol Biol* ; 49 : 515-21.
- **Faruki H., Sparling P. F. 1986.** Genetics of resistance in a non B-lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 30(6): 856-860.
- **Follath F., Costa E., Thommen A., Frei R., Burdeska A., Meyer J. 1987.** Clinical consequences of development of resistance to third generation cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol*; 6(4): 446-450.
- **Fosberry A. P., Payne D. J., Lawlor E. J., Hodgson J. E. 1994.** Cloning and sequence analysis of blabil-1, a plasmid-mediated class c beta-lactamase gene in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1182-1185.
- **Fourmaux S., Ros A., Salauze B., Talon D., et al. 1994.** "Observatoire des Klebsielles": description des malades porteurs de *Klebsiella pneumoniae* productrice de B-lactamase à spectre étendu dans 45 hôpitaux français. 14ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Infectieuse. 14/C2.
- **Fung C. P., Yeo S. F., Livermorre D. M. 1994.** Susceptibility of *Moraxella catarrhalis* isolates to B-lactams antibiotics in relation to B-lactamases type. *J. Antimicrob. Chemother.* (33): 215-222.
- **Galbraith L., Wilkison S.G., Legaris N.J., Genimata V., Katsorchis T. A., Rietschel E.T. 1984.** Structural alteration in the envelope of a gentamicin-resistant rough mutant of *P. aeruginosa* *Ann. Microbiol (Inst Pasteur).* 135B: 121-136.
- **Garnéro J. 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. techn. Encyclo. Me. Nat, (Paris-France). *Phytothérapie-Aromathérapie.*
- **Gazouli M., TzelepiE., Sidorenko S. V., Tzouveleki L. S. 1998.** Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A B-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1259-1262.
- **Georgopapadakou N. H. 1993.** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to B-lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 2045-2053.
- **Gerding D. N., Larson T. A., Hughes R. A., Weiler M., Shanholtzer C., Peterson L. R. 1991.** Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: ten years of experience in one hospital. *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 1284-90.
- **GERPB. 2004.** Groupe d'étude de la résistance de *P. aeruginosa* aux bêtalactamines. Surveillance de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux B-lactamines en milieu hospitalier. *Lettre Infectiologue* 2004. *Perspectives Pseudomonas.* France. XV. 14-16.

- **Ghuysen J. M. 1994.** Molecular structures of penicillin-binding proteins and B-lactamases. Trends Microbiol. 842: 372-380.
- **Girault C., Tamion F., Beduneau G. 2005.** Evaluation des soins et pneumopathies nosocomiales en réanimation. Revue des maladies respiratoires. Série « Evaluation des soins », pages 8-21.
- **Gniadkowski M., Schneider I., Palucha A., Jungwirth R., Mikiewicz B., Bauernfeind A. 1998.** Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 42: 827-832.
- **Goldmann D. A., Weinstein R. A., Wenzel R. P., Tablan O. C, Duma R. J, Gaynes R. P, Schlosser J., Martone W. J. 1996.** Strategies to Prevent and Control the Emergence and Spread of Antimicrobial-Resistant Microorganisms in Hospitals. A challenge to hospital leadership. JAMA. 275(3):234-240.
- **Gonzalez Leiza M., Perez-Diaz J. C., Ayala J., Casellas J. M., Martinez-Beltran J., Bush K., Baquero F. 1994.** Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated B-lactamase with two molecular variants. Antimicrob Agents Chemother. 38(9): 2150-2157.
- **Gouby A., Neuwirth C., Bourg G., Bouzigues N., Carles-Nurit M. J., Despaux E., Ramus M. 1994.** Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum B-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. J Clin Microbiol; 32: 301-5.
- **Govan J. R. W. 1995.** *Pseudomonas* : des germes pathogènes ou opportunistes ? Perspectives *Pseudomonas* ; 5 : 3-6.
- **Gruteke P., Goessens W., Van Gils J., Peerbooms P., Lemmens-Den T. N., Van Santen-Verheuel M., Van Belkum A., Vergrugh H. 2003.** Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum B-lactamase SHV-5 gene, and multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. J Clin Microbiol 41:1161–1166.
- **Guenther E. 1965.** The Essential Oils. Vol. I à VI, D. Van Norstand company Inc., N.Y.
- **Guinochet M., Vilmorin R. 1975.** Flore de France. Ed. C.N.R.S. Fascicule 2.
- **Hakenbeck R., Tarpay M., Tomasz A. 1980.** Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 17(3): 364-371.
- **Hall L. M., Livermore D. M., Gur D., Akova M., Akalin H. E. 1993.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) B-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 37(8): 1637-1644.

- **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Appl. Microbiol*, 86:985-990.
- **Hamze M., Izard D. 1997.** Sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques. Situation en 1997 au Nord du Liban. *Bactériologie hygiène. Méd.*
- **Hanberger H., Garcia-Rodriguez J. A., Gobernardo M., Goossens H., Nilsson L. E., Struelens M. J., and the French and Portuguese ICU Study Groups. 1999.** Antibiotic susceptibility among Gram-negative bacilli in intensive-care units in 5 European countries. *JAMA*; 281: 67-71.
- **Harder K. J., Nikaido H., Matsuhashi M. 1981.** Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain B-lactams compounds lack the OmpF porin. *Antimicrob Agents Chemother.* 20(4): 549-552.
- **Hedges R. W., Jacob A. E. 1974.** Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol. Gen. Genet.* 132: 31-40.
- **Hibbert-Rogers LC, Heritage J, Todd N, Hawkey PM. 1994.** Convergent evolution of tem-26, a beta-lactamase with extended-spectrum activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 707-720.
- **Horii T., Arakawa Y., Ohta M., Ichiyama S., Wacharotayankun R., Kato N. 1993.** Plasmid-mediated AmpC-type B-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum B-lactams, including moxalactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(5): 984-990.
- **Huletsky A., Knox J. R., Levesque R. C. 1993.** Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporin's by SHV-type B-lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 268: 3690-3697.
- **Ismaili-Allaoui M. 1983.** Pouvoir antiseptique de l'huile essentielle de thym sur les microorganismes du smen, mémoire de d'étude, Institut d'agronomie et vétérinaire. Rabat.
- **Iwu M. M., Chiori C. O. 1984.** Antimicrobial activity of *Eupatorium odoratum* extracts. *Phytotherapy*, 55(6): 354 - 356.
- **Jack G. W., Sykes R. B., Richmond M. H. 1970.** The B-lactamases of Gram-negative bacteria. *Postgrad Med J: Suppl:* 41-43.
- **Jacob M., Pellecuer J., Tomei R 1979.** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.* 11-30.
- **Jacobson K. L., Cohen S.H., Inciardi J. F., King J. H., Lippert W. E., Iglesias T., VanCouwenberghe C. J. 1995.** The relationship between antecedent antibiotic use and resistance to extended-spectrum cephalosporin's in group I B-lactamase-producing organisms. *Clin Infect Dis*; 21(5): 1107-1113.
- **Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1991.** More extended-spectrum B-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1697-1704.

- **Jacoby G. A., Sutton L. 1991.** Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum B-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 164-169.
- **Jacoby GA., Bush K. 2005.** B-lactamase nomenclature. *J. Clin Microbiol*; 43(12): 6220.
- **Jaffe A., Chabbert Y. A., Semonin O. 1982.** Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of B-lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 22(6): 942-948.
- **Jarlier V. 1988.** Phénotypes de résistance aux B-lactamines. Description et fréquence. Place d'*Enterobacter cloacae*. *Med Mal Inf. Hors série.* 32-40.
- **Jarlier V., Carbonne A., 1995.** Entérobactéries et B-lactamines. Lecture interprétative de l'antibiogramme. Lab de Bactériologie - Hygiène Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière. Paris. 6-13.
- **Jarlier V., Fosse T., Philippon A. and the ICU Study Group. 1996.** Antibiotic susceptibility in aerobic gram-negative bacilli isolated in intensive care units in 39 French teaching hospitals. *Intensive Care Med*; 22: 1057-1065.
- **Jarlier V. 2001.** Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français: bilan en 2000 et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Institut de veille sanitaire. France.1-6.
- **Jaurin B., Grundstrom T. 1981.** ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K₁₂ has a different evolutionary origin from that of B-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 78 (8): 4897-4901.
- **Jean F. I., Collin G. J., Lord D. 1992.** Essential oils and microwave extracts of cultivated plants, *Perf. Flav.* 17, 35-41.
- **Jenks P. J., Hu Y. M., Danel F., Mehtar S., Livermore D. M. 1995.** Plasmid-mediated production of class 1 (AmpC) B-lactamase by two *Klebsiella pneumoniae* isolates from the UK [letter]. *J Antimicrob Chemother.* 35(1): 235-236.
- **Kado CL, Liu S. 1981.** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*; 145: 1367-1373.
- **Kamoun A., Ben Hassen A., Ben Redjeb S. 1990.** Infections à pyocyanique et sensibilité aux antibiotiques. *Tunisie Médicale.* 68: 275-279.
- **Kaneko M., Yamaguchi A., Sawai T. 1985.** Energetics of tetracycline efflux system encoded by TnlO in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 193(2): 194-198.
- **Karray H., Hammami A., Mahjoub F., Bouaziz M., Dammak J., Jeddi H.M. 1993.** Etude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques de 213 souches de *P. aeruginosa* isolées au service de réanimation du CHU de Sfax- (Tunisie). *Path. Biol.* 41: 307-312.
- **Kaul R., Burt J. A., Cork L., Dedier H., Garcia M., Kennedy C., et al. 1996.** Investigation of a multiyear multiple critical care unit outbreak due to relatively drug-sensitive *Acinetobacter*

- baumannii*: risk factors and attributable mortality. J Infect Dis; 174:1279-87.
- **Kim B. N., Woo J. H., Kim M. N., Ryu J., Kim Y. S. 2002.** Clinical implications of extended-spectrum B-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* bacterium. J Hosp Infect; 52: 99–106.
 - **Kliebe C., Nies B. A., Meyer J. F., Tolxdorff-Neutzling R. M., Wiedemann B. 1985.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 302-307.
 - **Knothe H., Shah P., Kremery V., Antal M., Mitsuhashi S. 1983.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 11:315–317.
 - **Knox J. R. 1995.** Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type B-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob Agents Chemother. 39(12): 2593-2601.
 - **Korfmann G., Sanders C. C., Moland E. S., 1991.** Altered phenotypes associated with amp^d mutations in *Enterobacter cloacae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 358 -364.
 - **Laouer H., Zerroug M. M., Shakir A. N., Mebarki S., Ghomazi K. 1998.** Activités antibactériennes des extraits d'*Ammoïdes verticillata*. les XI éme journées Nationales de microbiologie, Université d'Oran, Algérie.
 - **Lautenbach E., Patel J. B., Bilker W. B., Edelstein P. H., Fishman N. O. 2001.** Extended-spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis; 32: 1162-1171.
 - **Le Floch E. 1983.** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Editions Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique.
 - **Lhoste P., Dolle V., Rousseau J., Soltner D. 1993.** Manuel de Zootechnie des régions chaudes. Les systèmes d'élevage. Collection précise d'élevage. Ministère de la Coopération, Paris. 288-289.
 - **Liassine N. 2000.** Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. Schweiz Med Wochenschr ; 130: 1930-1936.
 - **Lin M. F., Huang M. L., Lai S. H. 2003.** Risk factors in the acquisition of extended-spectrum B-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. J Hosp Infect; 53: 39-45.
 - **Lindberg F., Westman L., Normark S. 1985.** Regulatory components in *Citrobacter freundii* amp^C B-lactamase induction. Proc Natl Acad Sci. U S A. 82(14): 4620-4624.
 - **Ling B., Zhang M., Kong C., Pang X., Liang G. 2003.** Chemical composition of volatile oil from *Chromolaena odorata* and its effect on plant, fungi and insect growth. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 14(5): 744-6.

- countries: Dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type B-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3554-3560.
- **Paterson D., Bonomo R. 2005.** Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 657-686.
 - **Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Boucheberg M., Dusart G., Atisso M., Barthez M., Gourgas L., Pascal B., Tomei R. 1980.** Essais d'utilisation d'huile essentielle de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plantes médicinales et Phytothérapie*.
 - **Pellerin P. 1991.** Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry, *Perf; Flav*, 16(4).
 - **Pena C, Pujol M, Ricart A, et al. 1997.** Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum B-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect*; 35: 9-16.
 - **Pena C., Pujol M., Ardanuy C., et al. 1998.** Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *K. pneumoniae* producing extended-spectrum B-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 53-58.
 - **Perilli M., Felici A., Franceschini N., Santis A. D., Pagani L., et al. 1997.** Characterization of a new TEM-derived B-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41: 2374-2382
 - **Peyret M. 1994.** Mécanismes de résistances aux antibiotiques in manuel de bactériologie clinique, Freney P, Reaud F, Hansen W et Bollet C, p: 413 – 429, vol 1, 2^{ème} édition.
 - **Philippon A., Thabaut A., Meyran M., Nevot P. 1984.** Distribution des B-lactamines constitutives chez *P. aeruginosa*. *Presse Médicale*.13: 772-776.
 - **Philippon A., Labia R., Jacoby G. 1989.** Extended-spectrum B-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 33(8): 1131-1136.
 - **Philippon A., Arlet G. 2005.** Les B-lactamases chez les bacilles à gram négatif : que de nouveautés en 15 ans! *Antibiotiques* 2005; 7: 247-259.
 - **Piddock L. J. V., Walters R. N., Jin Y. F. et al. 1997.** *J Antimicrob Chemother*; 39 : 177-187.
 - **Pitout J. D. D., Thomson K. S., Hanson N. D., Ehrhardt A. F., Courdron P., Sanders C. C. 1998.** Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 596-600.
 - **Ploy M. C., Lambert T., Gassama A., Denis F. 2000.** Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Ann Biol Clin*; 58: 439-44.
 - **Poirel L., Menuteau O., Agoli N., Cattoen C., Nordmann P. 2003.** Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital.

- J Clin Microbiol; 41:3542-3547.
- **Poole K. 2000.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents*; 44: 2233–2241.
 - **Prinarakis E. E., Miriagou V., Tzelepi E., Gazouli M., Tzouvelekis L. S. 1997.** Emergence of an inhibitor-resistant B-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 838-840.
 - **Prodinger W. M., Fille M., Bauernfeind A., Stemplinger I., Amann S., Pfausler B., Lass-Flori C., Dierich M. P. 1996.** Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 B-lactamase: Parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J Clin Microbiol* 34: 564-568.
 - **Quale J. M., Landman D., Bradford P. A., Visalli M., Ravishankar J., Flores C., Mayorga D., Vangala K., Adedeji A. 2002.** Molecular epidemiology of a city wide outbreak of extended-spectrum B-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 35: 834– 841.
 - **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. dd. du Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), Paris. 671-672
 - **Quinn J.P. 1994.** Clinical significance of extended-spectrum B-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 13(Supp11): 39-42.
 - **Radstrom P., Swedberg G. 1988.** RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulIII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother.* 32(11): 1684-1692.
 - **Rahal K., Belouni R, Benslimani A., et al. 2005.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS.* 4^{ème} édition. Algérie. 46-52.
 - **Ramadan M. A., Tawfik A., F. Shibl A. M. 1995.** Effect of beta-lactamase expression on susceptibility of local isolates of *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Chemotherapy.* 193-199.
 - **Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M. 1993.** Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oil Res.*, 5, 179-184.
 - **Rice L. B., Willey S. H., Papanicolaou G. A., Medieros A. A., Eliopoulos G. M., Moellering J. R. C., Jacoby G. A. 1990.** Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum B-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2193-2199.
 - **Rice L. B., Eckstein E. C., Devente J., Shlaes D. M. 1996** Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. *Clin Infect Dis*; 23(1): 118-124.
 - **Richard H. 1985.** Épices et Aromates ; A.P.R.I.A. (Paris), 346-347.

- **Richard H. 1989.** Les arômes. Cahiers de nutrition et de diététique. XXIV, 2, 2-6.
- **Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H., Gaynes R. P. 1999.** Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med; 27: 887-92.
- **Richter G. 1993.** Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed Presses, polytechniques et universitaires romandes.
- **Roussel-Delvallez M. 2004.** Du bon usage es antibiotiques en établissement de santé. Des B-lactamines aux fluoroquinolones. Epidémiologie des résistances des bacilles à Gram négatif aux B-Lactamines. CHRU – Lille.
- **Sabaté M., Tarragó R., Navarro F., Miró E., Vergés C., Barbé J., Prats G. 2000.** Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing B-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1970-1973.
- **Salamone A., Scarito G., Somma V., 2001.** I prodotti naturali nella lotta contro alcuni funghi fitopatogeni. Notiziario delle Protezione delle Piante n. 13 (Nuova Serie): 143-148.
- **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 1. Cold Spnng Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- **Sanders C. C. 1989.** B-Lactamase stability and in vitro activity of oral cephalosporin's against strains possessing well-characterized mechanisms of resistance. Antimicrob Agents Chemother. 33(8): 1313-1317.
- **Sanders C. C., Sanders W. E. 1992.** B-lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. Clin. Mec. Dis. 15, 824-839.
- **Schiappa D. A., Hayden M. K., Matushek M. G., et al. 1996.** Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. J Infect Dis; 174: 529-536.
- **Senouci-Bereksi M., Abdelouahid D. E. 2005.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de la région de Tlemcen (*Thymus capitatus* .l. hoffman et link, *Salvia officinalis* .l, *Lavandula dentata* .l.). Thèse de magister. Institut de Biologie. Faculté des sciences. Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. Algérie.
- **Shapiro J., Sporn P.T. 1977.** Tn 402, a new transposable element determining trimethoprim resistant insert in bactériophage lambda. J. Bacteriol. 129:1632-1635.
- **Shaw W. V. 1984.** Bacterial resistance to chloramphenicol. Br Med Bull 40: 36-41.
- **Shaw D., Poxton I. R., Govan J. R. W. 1995.** Biological activity of *Bukholderia* (*Pseudomonas*) *Cepacia* lipopolysaccharide. FEMS Immun Med Microb; 11 : 99-106.

- **Shaw K. J., Rather P. N, Hare R. S, Miller G. H. 1993.** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 57(1): 138-163.
- **Shlaes D., Gerding D. N., John J. F., et al. 1997.** Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 18: 275-291.
- **Singh A. K., Dikshit A., Dixit S. M. 1983.** Fungi-toxic properties of essential oil of menthe arvensis varpepiraxens. *Perfumer and flavorist.* 55-58.
- **Sirot D., Sirot J., Labia R., Monrad A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., Cluzel R. 1987.** Transferable resistance to third-generation cephalosporin's in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel B-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 20 (3): 323-334.
- **Sirot J. 1996.** Detection of extended-spectrum plasmid-mediated B-lactamases by disk diffusion. *Clin Microbiol Infect.* 2 Suppl 1: 35-39.
- **Sirot D., Recule C., Chaibi E. B., Bret L., Croize J., Chanal-Claris C., Labia R., and Sirot J. 1997.** A complex mutant of TEM-1 B-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1322-1325.
- **Soilleux M. J. Morand A. M. Arlet G. J. Scavizzi M. R. Labia R. 1996.** Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of tem-3 and first identification of tem-26 in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1027-1029.
- **Sougakoff W., Trystram D. 2003.** Résistances aux B-lactamines. Service de Bactériologie - Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière. *Journal of Structural Biology. Méd. PARIS.* 31-38.
- **Spencer R. C., Wheat P. F., Winstanley T. G., Cox D. M., Plested S. J. 1987.** Novel B-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to B-lactam antibiotics. *J. Antimicrob Chemother.* 20: 919-921
- **Spratt B. G., Zhang Q. Y., Jones D. M., Hutchison A., Brannigan J. A., Dowson C. G. 1989.** Recruitment of a penicillin-binding protein in gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 86(22): 8988-8992.
- **Stratton C. W. 2000.** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J*; 48:186-198.

- **Sundstrom L., Radstrom P., Swedberg G., Skold O. 1988.** Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21, *Mol Gen Genet*, 213(2-3): 191-201.
- **Sutcliffe J. G. 1978.** Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3737-3741.
- **Taoussi M. 1992.** Extraction des huiles essentielles : Effet de la technologie utilisée sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle. Application à l'*Eucalyptus camaldulensis* Dehn; mémoire de 3^e cycle agronomique option: Industries Agricoles et Alimentaires; I.A.V. Hassan II, Rabat.
- **Thabalit A., Girardet M., Gaillardo M. C., Meyran M. 1989.** Incidence et distribution des B-lactamases constitutives de *P. aeruginosa* (1981-86) conséquence sur la sensibilité aux B-lactamines. *Méd. Mal. Infect*: 72-78.
- **Thabaut A., Phalippon A., Paul G. 1984.** Nouvelle B-lactamase (carbénicilase) chez *P. aeruginosa*; *Presse médicale*.13: 14-55.
- **Thomson K. S., Sanders C. C. 1992.** Detection of extended-spectrum B-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1877-1882.
- **Toltzis P., Blumer J. L. 1995.** Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in the critical care setting. *Pediatr Clin North Am*; 42(3): 687-702.
- **Trias J., Dufresne J., Levesque R. C., Nikaido H. 1989.** Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(8): 1202-1206.
- **Tzouvelekis L. S., Tzelepi E., Tassios P. T., Legakis N. J. 2000.** CTX-M-type B-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 137-143.
- **Ultee A., Slump R. A., Steging G., Smid E.J. 2000.** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice, *J of Food Protection*, 620-624.
- **Urban C., Meyer K. S., Mariano N., Rahal J. J., Flamm R., Rasmussen B. A., Bush K. 1994.** Identification of TEM-26 B-lactamase responsible for a major outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 392-395.
- **Vahaboglu H., Dodanli S., Eroglu C., Öztürk R., Soyletir G., Yildirim I., Avkan V. 1996.** Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2942-2946.

- **Valnet J. 1984.** Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. 10^{ème} ed. Maloine. Paris.
- **Vedel G., Mabilat C., Goussard S., Picard B., Fournier G., Gilly L., Paul G., Philippon A. 1992.** Two variants of transferable extended-spectrum TEM B-lactamase successively isolated from a clinical *Escherichia coli* isolate. FEMS Microbiol Lett. 72 (2): 161-166.
- **Vedel G., Ratovoherdy D., Paul G., Navot P. 1994.** Phénotypes de résistance des Entérobactéries aux B-lactamines. Laboratoire jouveimal, éd. Pyramide. Santé. Paris. 103- 104.
- **Venezia R. A., Scarano F. J., Preston K. E., Steele L. M., Root T. P., Limberger R., Archinal W., Kacica M.A. 1995.** Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum B-lactamase in Enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis 21: 915-923.
- **Villegas M. V., Hartstein A. I. 2003.** *Acinetobacter* outbreaks 1977-2000. Infect Control Hosp Epidemiol; 24: 284-95.
- **Voss A., Milatovic D., Wallauch-Schwartz C., Roscani V. T., Branevyl. 1994.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 13: 30-5.
- **Wharton R. H. 1976.** Les maladies du bétail transmises par les tiques et leurs vecteurs: résistance aux acaricides. Revue Mondiale de Zootechnie, FAO, 20: 8-15.
- **Yang Y., Wu P., Livermore D. M. 1990.** Biochemical characterization of a B-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. (34): 755-758.

Annexe 01: Milieux de culture

Milieu de Mac conkey (en g/l):

Peptone caséine	17	
Peptone de viande	3	
Lactose	10	
Sels biliaires	1.5	pH: 7.1
NaCl	5	
Rouge neutre	0.03	
Cristal violet	0.001	
Agar	13.5	

Gélose nutritive (en g/l):

Peptone	15	
Extrait de viande	10	pH: 6.8 – 7.6
Extrait de levure	2	
NaCl	5	
Agar	20	

Milieu de Mueller Hinton (en g/l):

Infusion de viande de bœuf	10	
Hydrolysate de caséine	17.5	pH: 7.4
Amidon	1.5	
Agar	17	

Bouillon nutritif (en g/l):

Peptone	15	
Extrait de viande	10	pH: 6.8 – 7.6
Extrait de levure	2	
NaCl	5	

Bouillon cœur cervelle (en g/l):

Infusion de cervelle de veau	200	
Infusion de cœur de bœuf	250	
Peptone de gélatine	10	pH: 7.4
NaCl	5	
Phosphate disodique	2.5	
Glucose	2	

Milieu de Cétrimide:

Peptone	20	
Sulfate de potassium	10	
Chlorure de magnésium	3	pH = 7.2
Phosphate dipotassique	0,3	
Cétrimide	0,3	
Agar (gélose)	13,5	

Annexe 02: Quelques solutions utilisées

1- Les solutions d'ATB utilisées:

- ***L'acide nalidixique:*** La solution mère 10g/l est préparée en mélangeant la poudre d'antibiotique dans un demi-volume d'eau distillée et en ajoutant du NaOH 1M goutte à goutte jusqu'à dissolution. Compléter jusqu'au volume nécessaire par l'eau distillée et aliquoter dans des tubes eppendorff conserver à (-20°C°).
- ***L'amoxicilline:*** La solution mère 100g/l est préparée en mélangeant la poudre d'antibiotique dans le d'eau distillée stérile. Aliquoter dans des tubes eppendorff, conserver à (-20°C°).

2- Préparation des boîtes de sélection utilisées dans la conjugaison:

➤ Boîtes de sélection des transconjugants:

Mettre dans chaque boîte de Pétri, 18 ml de gélose M-H, 1ml de l'antibiotique à caractère suspecté plasmidique (Amoxicilline, par exemple) de la donatrice et 1ml de l'antibiotique à caractère suspecté chromosomique (Amoxicilline, par exemple) de la réceptrice à des concentrations finales permettant de sélection les transconjugants et inhiber la croissance de souches parentales.

➤ Boîtes de contrôle:

Ce son des boîtes de sélection des transconjugants dans lesquelles sontensemencées en stries les souches donatrices, réceptrices et le mélange pur et dilué obtenue après conjugaison. Elle permettent de vérifier que seuls les transconjugants poussent; les souches parentales ne doivent pas pousser sur ces boîtes.

3- Solutions employées dans l'extraction plasmidique:

Tampon TE: Tris 50mM

EDTA 10mM pH: 8.0

Solution de lyse: SDS (Soduim Dodécyl Sulfate) 3%

Tris 50mM pH: 12.6

4- Solutions employées dans l'électrophorèse:

Tampon TBE: Tris 89M

Acide borique 89mM

EDTA-Na₂ 2.5mM

Tableau N°16: Résultats de l'identification des Entérobactéries isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.
(Par Galerie API 20E).

Souches	Genres – Espèce	Biotypes
<i>K₂ – K₃ – K₆ – K₉ – K₁₂ – K₁₃ – K₁₅ – K₁₈ – K₂₁ – K₂₃ – K₂₄ – K₂₅ – K₃₀ – K₃₂ – K₃₃ – K₃₄ – K₃₇ – K₃₉ – K₄₀</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	5215773 1215772 1215773
<i>K₅ – K₇ – K₁₁ – K₁₆ – K₁₉ – K₂₆ – K₂₈ – K₂₉ – K₃₁ – K₃₅ – K₃₆</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	1004143 1004163 1004522 1004152 1004552
<i>K₁ – K₁₀ – K₃₈</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	5205773
<i>En₁ – En₂ – En₃ – En₄ – En₅ – En₆ – En₇ – En₈ – En₉ – En₁₀ – En₁₁ – En₁₂ – En₁₃ – En₁₄ – En₁₅ – En₁₆ – En₁₇ – En₁₈</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	3305573 3305572
<i>En₁₉ – En₂₀ – En₂₁</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	5305773 5305573
<i>En₂₄ – En₂₅</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	5315172
<i>En₂₂</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	1104552
<i>En₂₆</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	1304523
<i>En₂₇</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	3305553
<i>En₂₃</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	3305373
<i>E₁ – E₃ – E₄ – E₆ – E₈ – E₁₀ – E₁₁ – E₁₂ – E₁₃ – E₁₄ – E₁₅</i>	<i>E.coli 1</i>	5144552 5144152 5144572 5044572
<i>E₂ – E₇</i>	<i>E.coli 2</i>	5044512 1044512
<i>Ae₂</i>	<i>Hafnia alvei 1</i>	5305112
<i>Ae₁ – Ae₄</i>	<i>Citrobacter koserii</i>	3344513 3344532
<i>Ae₅</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	4004102

Tableau N°17: Résultats de l'identification de *Pseudomonas* sp et *Acinetobacter baumannii* isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.
(Par Galerie API 20E et Galerie API 20NE).

<i>Souches</i>	<i>Genres – Espèce</i>	<i>Biotypes</i>
<i>P</i> ₂ – <i>P</i> ₃ – <i>P</i> ₈ – <i>P</i> ₉ – <i>P</i> ₁₀ – <i>P</i> ₁₁ – <i>P</i> ₁₄ – <i>P</i> ₁₇ – <i>P</i> ₁₉ – <i>P</i> ₂₁ – <i>P</i> ₂₂ – <i>P</i> ₂₃ – <i>P</i> ₂₄ – <i>P</i> ₂₇ – <i>P</i> ₂₉ – <i>P</i> ₃₄ – <i>P</i> ₃₅ – <i>P</i> ₃₈ – <i>P</i> ₃₉ – <i>P</i> ₄₂ – <i>P</i> ₄₃ – <i>P</i> ₄₄ – <i>P</i> ₄₆ – <i>P</i> ₄₇ – <i>P</i> ₅₀ – <i>P</i> ₅₂ – <i>P</i> ₅₇ – <i>P</i> ₅₉ – <i>P</i> ₆₀	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1154571 – 2206000 – 2202000.
<i>P</i> ₁₃ – <i>P</i> ₃₂ – <i>P</i> ₅₅	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1157551 – 0146672
<i>A</i> ₁ – <i>A</i> ₄ – <i>A</i> ₆	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0004042 – 0040472

A: Acinetobacter baumannii

Ae: Autre entérobactéries

E: Escherichia coli

En: Enterobacter sp

K: Klebsiella sp

P: Pseudomonas sp

4	K_{11}	CF – AMX – TIC – NA
3	$K_{26} - K_{28}$	CF – AMX – TIC
	K_{34}	CF – AMX – NA
2	$K_{25} - K_{31}$	CF – AMX
1	$K_1 - K_{35}$	CF
	K_{10}	AMX
0	$K_3 - K_9$	

Tableau N°20: Antibiotypes de souches *E. coli* isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
11	E_{14}	FEP – CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – GM
10	E_3	FEP – CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – GM
	E_{11}	CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – GM – STX
9	E_2	CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – GM – NA
8	E_{13}	FEP – CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – GM
6	E_6	CF – FOX – AMX – AMC – OFX – NA
	E_8	CTX – AMX – TCC – OFX – GM – NA
3	E_7	AMX – AMC – OFX
	E_{10}	CF – OFX – NA
1	$E_1 - E_{12} - E_{15}$	CF
0	E_4	

Tableau N°21: Antibiotypes des autres souches d'Entérobactéries isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
5	Ae_2	CF – AMX – TIC – TCC – NA
1	Ae_1	CF
	Ae_4	AMX
0	Ae_5	

Tableau N°22: Antibiotypes de souches *Enterobacter sp* isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
15	En ₁₂	FEP – CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – AN – GM – FOS – NF – C – STX
14	En ₁	FEP – CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – CIP – AN – GM – NF – C – STX
	En ₁₇	FEP – CF – FOX – CTX – AMX – TIC – OFX – CIP – AN – GM – FOS – NF – C – STX
13	En ₁₈	FEP – CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – GM – NF – C – STX
12	En ₉	FEP – CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – GM – NF – C
	En ₁₃ – En ₁₆	FEP – CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – CIP – GM – C – STX
11	En ₁₅	CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – C – STX
	En ₁₉	CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – CIP – NF – STX
9	En ₄	CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – C
	En ₂₀	CF – CTX – AMX – AMC – TIC – OFX – GM – NF – STX
8	En ₂ – En ₃ – En ₅ – En ₆	CF – FOX – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX
	En ₈	CF – CTX – AMX – AMC – TIC – TCC – GM – C
	En ₁₀	CF – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – GM – STX
7	En ₇	CF – AMX – AMC – TIC – TCC – OFX – NA
5	En ₁₄	AMX – TIC – TCC – STX – NA
	En ₂₁	CF – AMX – TIC – OFX – NA
	En ₂₆	CF – AMX – TIC – TCC – NA
4	En ₁₁	AMX – AMC – TIC – TCC
	En ₂₃	CF – AMX – AMC – NA
	En ₂₇	CF – AMX – AMC – TIC
1	En ₂₂ – En ₂₅	AMX – OFX

Tableau N°23: Antibiotypes de souches *Pseudomonas* sp isolées à partir des sondes d'intubation en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
12	P ₅₈	TIC – TCC – CAZ – PIP – OFX – CIP – GM – FOS – C – STX – TE – RA
11	P ₃₁	TIC – TCC – PIP – OFX – CIP – GM – FOS – C – STX – TE – RA
	P ₃₃	TIC – TCC – CAZ – PIP – OFX – CIP – GM – C – STX – TE – RA
	P ₆₁	TIC – TCC – CAZ – OFX – AN – GM – TM – C – STX – TE – RA
	P ₆₂	TIC – TCC – PIP – OFX – CIP – AN – GM – TM – C – STX – TE – RA
10	P ₁	TIC – TCC – OFX – AN – GM – FOS – C – STX – TE – RA
	P ₅₁ - P ₆₃	TIC – TCC – CAZ – PIP – OFX – GM – C – STX – TE – RA
9	P ₅ – P ₃₆	TIC – TCC – CIP – GM – OFX – C – STX – TE – RA
	P ₂₈	TIC – TCC – OFX – GM – FOS – C – STX – TE – RA
	P ₃₇	TIC – TCC – IPM – OFX – CIP – C – STX – TE – RA
	P ₅₄ – P ₅₃	TIC – TCC – CAZ – PIP – OFX – C – STX – TE – RA
	P ₅₆	TIC – TCC – PIP – OFX – FOS – C – STX – TE – RA
8	P ₄ – P ₄₀	TIC – TCC – OFX – FOS – C – STX – TE – RA
	P ₁₂	TIC – TCC – OFX – GM – C – STX – TE – RA
	P ₁₈	TIC – TCC – OFX – FOS – C – STX – TE – RA
	P ₄₁	TIC – TCC – OFX – CIP – C – STX – TE – RA
	P ₄₅	TIC – TCC – PIP – OFX – C – STX – TE – RA
	P ₄₈	TIC – OFX – CIP – FOS – C – STX – TE – RA
7	P ₆ – P ₇ – P ₂₀ – P ₂₅ – P ₃₀ – P ₄₉	TIC – TCC – OFX – C – STX – TE – RA
6	P ₂₆	TIC – TCC – OFX – C – STX – TE
5	P ₁₅	OFX – C – STX – TE – RA
4	P ₁₆	TIC – OFX – STX – TE

6	<i>P</i> ₃₅	<i>TIC – TCC – OFX – C – TE – RA</i>
5	<i>P</i> ₁₇	<i>FOS – C – STX – TE – RA</i>
	<i>P</i> ₂₁	<i>OFX – C – STX – TE – RA</i>
4	<i>P</i> ₂₄	<i>C – STX – TE – RA</i>
	<i>P</i> ₄₆	<i>TIC – C – STX – RA</i>

Tableau N°25: Antibiotypes de souches *Acinetobacter baumannii* isolées à partir des sondes d'intubation en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
11	<i>A</i> ₂	<i>TIC – TCC – PIP – OFX – AN – GM – FOS – C – STX – TE – RA</i>
10	<i>A</i> ₆	<i>TIC – TCC – CAZ – OFX – GM – FOS – C – STX – TE – RA</i>
1	<i>A</i> ₅	<i>TE</i>

Tableau N°26: Antibiotypes de souches *Acinetobacter baumannii* isolées du portage digestif en service de réanimation .CHU Tlemcen.

N° ATB	Souches résistantes	Antibiotypes
10	<i>A</i> ₁	<i>TIC – TCC – OFX – AN – GM – FOS – C – STX – TE – RA</i>
9	<i>A</i> ₃	<i>TIC – TCC – OFX – GM – FOS – C – STX – TE – RA</i>
4	<i>A</i> ₄	<i>TIC – TCC – TE – RA</i>

Tableau N°27: Diamètres des zones d'inhibitions de 6 souches d'Entérobactéries vis-à-vis les antibiotiques testés (en mm).

<i>ATB</i> Souches	<i>FEP</i>	<i>CF</i>	<i>FOX</i>	<i>CTX</i>	<i>AMX</i>	<i>AMC</i>	<i>TIC</i>	<i>TCC</i>	<i>CIP</i>	<i>GM</i>
<i>K₄</i>	16,5	R	17	9,5	R	16	R	17,5	20	R
<i>K₅</i>	18	R	18	11	R	14	R	13	19	R
<i>En₁₂</i>	11,5	R	R	R	R	R	R	R	16	R
<i>En₁₇</i>	10,5	R	R	R	R	R	R	R	14	R
<i>E₉</i>	18	R	19,5	14,5	R	17	R	18	21,5	R
<i>E₁₄</i>	16,5	R	20	13	R	14	R	14	23	R

Tableau N°28: Diamètres des zones d'inhibitions de deux souches *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les antibiotiques testés (en mm).

<i>ATB</i> Souches	<i>TIC</i>	<i>TCC</i>	<i>CAZ</i>	<i>PIP</i>	<i>OFX</i>	<i>CIP</i>	<i>AN</i>	<i>GM</i>	<i>FOS</i>	<i>C</i>
<i>P₅₀</i>	R	11	12	14	R	17,5	13,5	R	11	R
<i>P₅₂</i>	R	R	R	11	R	15	12	R	R	R

Tableau N°29: Diamètres des zones d'inhibitions de deux souches *Acinetobacter baumannii* vis-à-vis les antibiotiques testés (en mm).

<i>ATB</i> Souches	<i>TIC</i>	<i>TCC</i>	<i>OFX</i>	<i>AN</i>	<i>GM</i>	<i>FOS</i>	<i>C</i>	<i>STX</i>	<i>TE</i>	<i>RA</i>
<i>A₁</i>	R	R	17,5	12	R	12	R	12	R	R
<i>A₂</i>	R	R	15	10	R	13,5	R	R	R	R