

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

**Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen**



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

**Département de Biologie**

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie  
Option : Biochimie appliquée

**THEME**

***Etude de la résistance aux antibiotiques des  
entérobactéries au CHU de Tlemcen***

Présenté par

***Melle AYAD Amel***

Devant le jury composé de

Mme BOUCHERIT Z

Mr BOUCHERIT K

Mme HASSAÏNE H

Mr DRISSI M

Président

Examinateur

Examinateur

Promoteur

***Année Universitaire : 2010-2011***

Mag - Bio - 200/01

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

**Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen**



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

**Département de Biologie**

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie  
Option : Biochimie appliquée

**THEME**

***Etude de la résistance aux antibiotiques des  
entérobactéries au CHU de Tlemcen***

Présenté par

***Melle AYAD Amel***

Devant le jury composé de

- Mme BOUCHERIT Z
- Mr BOUCHERIT K
- Mme HASSAÏNE H
- Mr DRISSI M

Inscrit sous le N° 14943  
Date le 27.01.2011  
Cote .....



- Président
- Examineur
- Examineur
- Promoteur

***Année Universitaire : 2010-2011***

# REMERCIEMENTS

*Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon promoteur Mr DRISSI M, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant au sein de son équipe. Je le remercie également pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur scientifique et ses prodigieux conseils. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements s'adressent également à*

*Mme BOUCHERIT Z, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*Mr BOUCHERIT K, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid et directeur du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques », de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire. Je le remercie d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*Mme HASSAÏNE H Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour le temps précieux qu'elle a accordé à cette étude. Je la remercie d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*Melle BABA AHMED Z, Maitre assistante à l'Université Abou Bekr Belkaid, Melle MESLI E et Melle BERRAZEG M, pour leur collaboration et leur contribution à l'avancement de ce travail par leur savoir et leurs idées.*

*Je tiens à remercier aussi*

*Les techniciens du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques ».*

*Mme BENHADDOUCHE R, chef de service de réanimation, Mr BEKHTI, responsable des infirmiers ainsi que le personnel aide soignant du service de Réanimation du CHU de Tlemcen.*

*Mr HASSAÏN, responsable des infirmiers ainsi que le personnel aide soignant du service de Traumatologie du CHU de Tlemcen.*

*Mr MAAZOUZI, responsable des infirmiers ainsi que le personnel aide soignant du service de chirurgie B du CHU de Tlemcen.*

# *DEDICACES*

*Je dédie cet humble mémoire*

*A*

*Mes très chers parents,*

*Pour leur amour, leurs encouragements et leurs sacrifices.*

*Mon frère Mohamed, mes sœurs Wafaa et Imene et toute ma famille*

*Mes amis Lamia, Asma, Zakat, Meryem, Djamila, Hanane, Soumia, Nourddine, Tarek et  
Mohamed*

# Résumé

Un total de 112 souches d'entérobactéries a été collecté à partir de divers services du CHU de Tlemcen entre octobre 2008 et juin 2009. *Escherichia coli* est l'espèce majoritaire (40.2%), suivie de *Klebsiella pneumoniae* (39.3%) et *Enterobacter cloacae* (12.5%). Les taux de résistance aux antibiotiques des souches étudiées, déterminés par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé selon les normes du CA-SFM, étaient les suivants : ampicilline (95.5%), amoxicilline (98.2%), ticarcilline (89.3%), pipéracilline (79.5%), mezlocilline (82.1%), céfalotine (85.7%), céfoxitine (25.9%), céfotaxime et ceftriaxone (72.3%), ceftazidime (75%), aztréonam (68.8%), gentamicine et tobramycine (66.1%), amikacine (6.3%), acide nalidixique (75%), ciprofloxacine (59.8%), triméthoprime/sulfaméthoxazole (67%) et colistine (5.4%). L'imipénème a montré une très bonne activité avec 100% de bactéries sensibles. La résistance aux  $\beta$ -lactamines a été associée à la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (66.7%), la production de céphalosporinases AmpC (16.1%) et la production de pénicillinases (10.7%). L'analyse du contenu plasmidique des souches productrices de BLSE par électrophorèse sur gel d'agarose a révélé la présence d'un plasmide commun de taille supérieure à 55 kb.

Mots clés : Entérobactéries, antibiotiques,  $\beta$ -lactamines, résistance, BLSE, AmpC, conjugaison bactérienne, électrophorèse sur gel d'agarose.

# *Abstract*

A total of 112 strains of Enterobacteriaceae was collected from various units of university-affiliated Hospital of Tlemcen between October 2008 and June 2009. *Escherichia coli* is the major species (40.2%) followed by *Klebsiella pneumoniae* (39.3%) and *Enterobacter cloacae* (12.5%). The antibiotic resistance rates of studied samples, determined by the agar diffusion disk method according to CA-SFM, were as follows: ampicillin (95.5%), amoxicillin (98.2%), ticarcillin (89.3%), piperacillin (79.5%), mezlocillin (82.1%), cefalotin (85.7%), cefoxitin (25.9%), cefotaxime and ceftriaxon (72.3%), ceftazidime (75%), aztreonam (68.8%), gentamicin and tobramycin (66.1%), amikacine (6.3%), nalidixic acid (75%) ciprofloxacin (59.8%), trimethoprim/sulfamethoxazole (67%) and colistin (5.4%). The imipenem showed an excellent activity with 100% of susceptible bacteria. Resistance to  $\beta$ -lactams was linked to the production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) (66.7%), the production of AmpC cephalosporinases (16.1%) and the production of penicillinases (10.7%). The study of plasmid content of ESBL-producing strains by agarose gel electrophoresis revealed the presence of a common plasmid with a size greater than 55 kb.

Keywords: Enterobacteriaceae, Antibiotics,  $\beta$ -lactam, resistance, ESBL, AmpC, Mating experiments, agarose gel electrophoresis.

## Liste des abréviations

ADH : Arginine DiHydrolase  
AM : ampicilline  
AMC : amoxicilline + acide clavulanique  
AMX : amoxicilline  
AN : amikacine  
ARNm : ARN messenger  
ATM : aztréonam  
BET : bromure d'éthidium  
BGN : bacilles à Gram négatif  
BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu  
C1G : céphalosporine de première génération  
C2G : céphalosporine de deuxième génération  
C3G : céphalosporine de troisième génération  
C4G : céphalosporine de quatrième génération  
CASE : céphalosporinase  
CAZ : ceftazidime  
CF : céfalotine  
CIP : ciprofloxacine  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
CRO : ceftriaxone  
CS : colistine  
CTX : céfotaxime  
DO : Densité Optique  
E : *Escherichia coli*  
Ec : *Enterobacter cloacae*  
EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra Acide acétique  
FOX : céfoxitine  
GM : gentamicine  
IPM : imipénème

Kb : Kilobase

Kp : *Klebsiella pneumoniae*

LPS : lipopolysaccharide

MZ : mezlocilline

NAG : N-acetyl glucosamine

NAM : N-acetyl muramique

nm : nanomètre

ODC : Ornithine DéCarboxylase

PASE ; pénicillinase

PBPs : Penicillin-binding proteins

PIP : pipéracilline

PLPs : protéines liant la pénicilline

Rif R : résistance naturelle à la rifampicine

rpm : rotation par minute

SAM : ampicilline + sulbactam

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SXT : triméthoprim/sulfaméthoxazole

T.S.I : Triple Sugar Iron agar

TBE : Tris-Borique acid-EDTA

Tc : transconjugant

TCC : ticarcilline + acide clavulanique

TE : Tris-EDTA

TIC : ticarcilline

TM : tobramycine

Tris : Hydroxymetyl amino-methane

TZP : pipéracilline + tazobactam

UFC : Unité Formant Colonie

VP : Voges Proskauer

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
 <i>Synthèse bibliographique</i>	
<b>1. Entérobactéries .....</b>	<b>2</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	3
1.3 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	3
1.4 <i>Proteus spp.</i> .....	4
1.5 <i>Serratia spp.</i> .....	4
<b>2. Antibiotiques .....</b>	<b>5</b>
2.1 $\beta$ -lactamines .....	6
2.1.1 Définition .....	6
2.1.2 Classification .....	6
2.1.3 Mécanisme d'action .....	8
2.2 Quinolones .....	10
2.3 Aminosides .....	11
<b>3. Mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques .....</b>	<b>13</b>
3.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	13
3.1.1 Altération de la perméabilité membranaire .....	13
3.1.2 Systèmes d'efflux .....	13
3.1.3 Modification des protéines liant la pénicilline .....	14
3.1.4 Résistance enzymatique par production de $\beta$ -lactamases .....	15
3.1.4.1 Résistance enzymatique naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	17
3.1.4.2 Résistance enzymatique acquise des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	18
3.2 Résistance aux quinolones .....	23
3.3 Résistance aux aminosides .....	23
 <i>Matériel et Méthodes</i>	
<b>1. Matériel .....</b>	<b>24</b>

## 2.1 $\beta$ -lactamines

### 2.1.1 Définition

Du fait de leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action, les  $\beta$ -lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans les traitements des infections causées par les *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2006).

La structure de base des  $\beta$ -lactamines (figure 2) est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999).

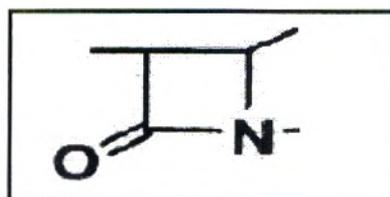


Figure 2. Cycle Lactame (Cavallo et al., 2004).

### 2.1.2 Classification

Les  $\beta$ -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par héli-synthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base (Soussy, 2000). On distingue : pénames, céphèmes, pénèmes, monobactames et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (figure 3).

#### ▪ Pénames (pénicillines)

Il s'agit d'une vaste famille de produits ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau  $\beta$ -lactame. Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6. Ce sont : les phénoxpénicillines et analogues de la pénicilline G, la méthicilline et les isoxazolylpénicillines, les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les acyluréidopénicillines, les amidinopénicillines, les pénicillines sulfonées et les méthoxycarboxypénicillines (Cavallo et al., 2004).

#### ▪ Céphèmes (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle hexagonal saturé (cycle dihydrothiazine) (Calderón et Sabundayo, 2007). Les nombreux radicaux de substitution

expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (Cavallo et al., 2004).

▪ **Pénèmes**

Les pénèmes se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle  $\beta$ -lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes : les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes (Bryskier, 1999).

▪ **Monobactames**

Se caractérisent par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle  $\beta$ -lactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit (Cavallo et al., 2004).

▪ **Inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases**

Il s'agit de l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam. Ce sont des  $\beta$ -lactamines qui possèdent une activité antibactérienne mais à des concentrations non compatibles en thérapeutique. Associés à une  $\beta$ -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par des  $\beta$ -lactamases. Le sulbactam et le tazobactam sont des sulfones de l'acide pénicillanique, alors que pour l'acide clavulanique, le soufre du cycle thiazolidine est remplacé par un oxygène (clavame ou oxapéname) (Kazmierczak, 1999).

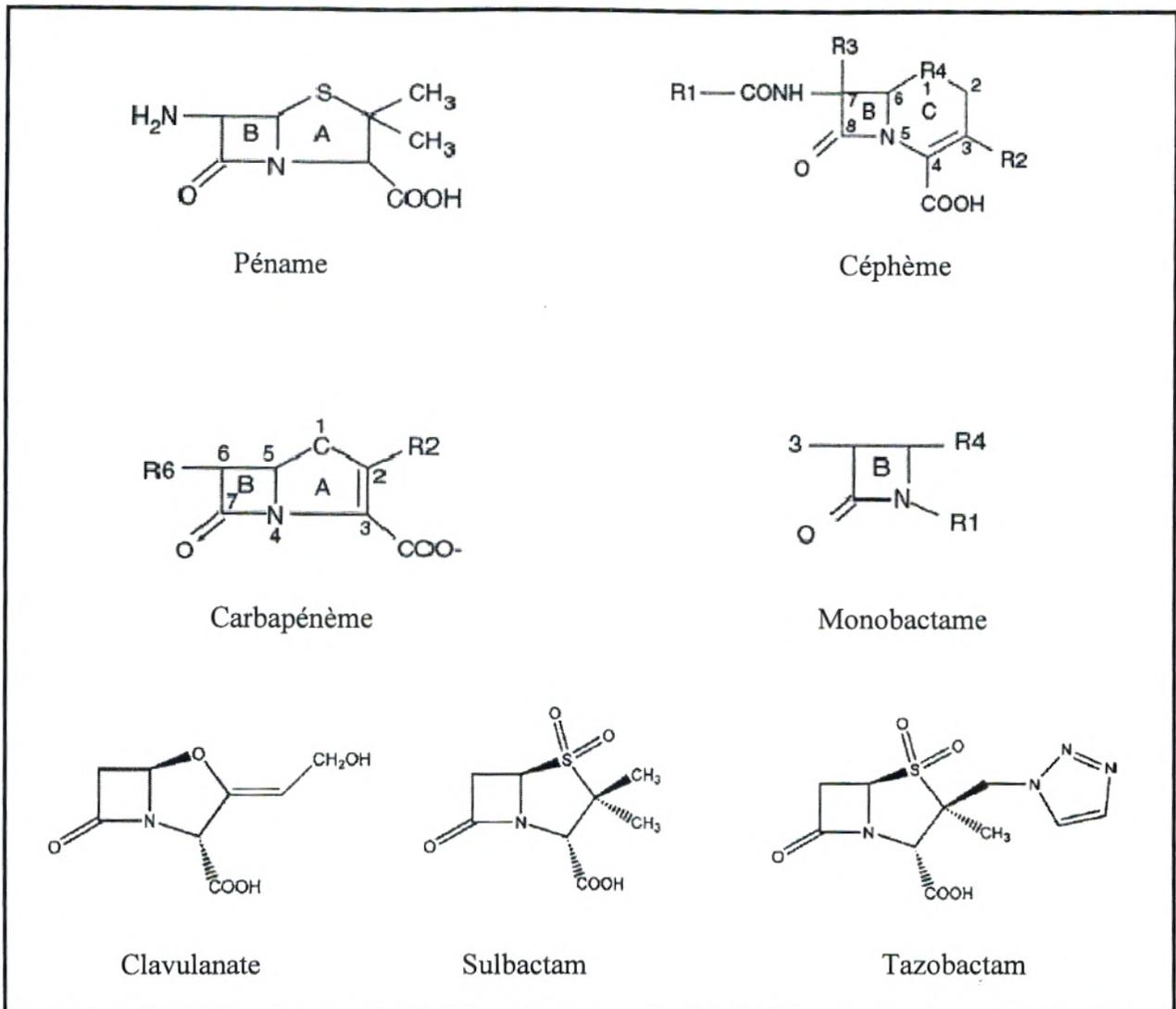


Figure 3. Principales structures des  $\beta$ -lactamines (Cavallo et al., 2004 ; Bonomo, 2006).

### 2.1.3 Mécanisme d'action

Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action, elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Cavallo et al., 2004). En effet, seules les cellules en croissance active sont touchées par ce type d'antibiotiques (Tortora et al., 2003).

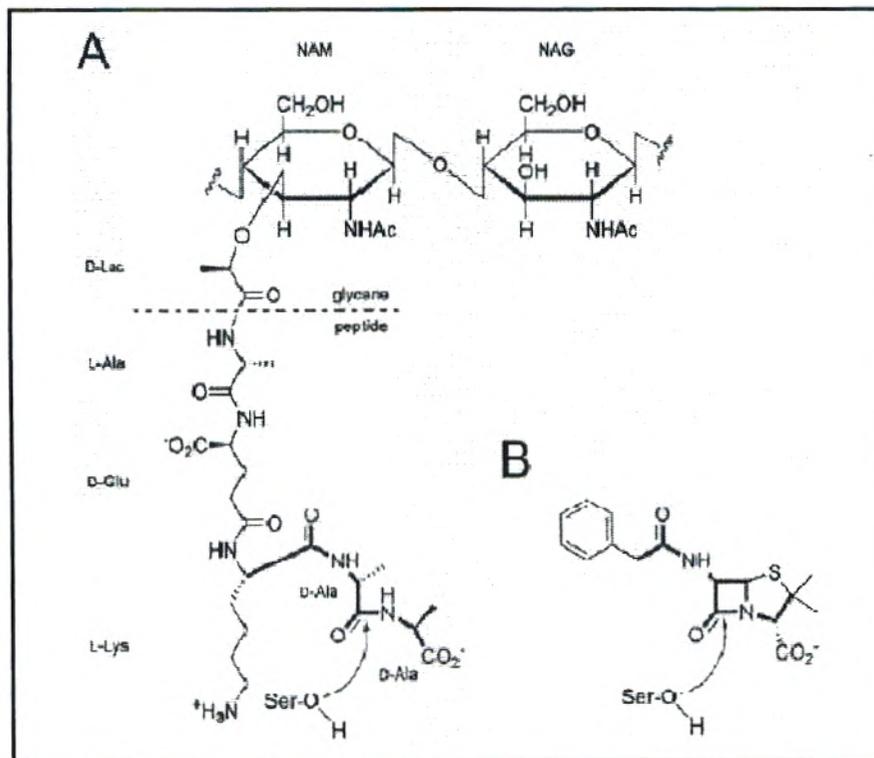
La compréhension du processus de synthèse de peptidoglycane permet de mieux comprendre le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines. Ce processus comporte plusieurs étapes qui conduisent à la formation, dans le cytoplasme, de deux précurseurs nucléotidiques, qui sont ensuite assemblés sur un transporteur lipidique et transférés à la face externe de la membrane cytoplasmique sous la forme de disaccharides peptidiques, NAG et NAM

(Charlier et al., 1998). Cette biosynthèse se termine par deux étapes qui font intervenir deux types majeurs de réactions enzymatiques (Gangoue Pieboji, 2007) :

- ✓ Les glycosyltransférases qui catalysent la formation de la chaîne polyssacharidique linéaire ;
- ✓ Les transpeptidases qui catalysent la formation des liaisons peptidiques croisées assurant ainsi la réticulation de l'hétéropolymère.

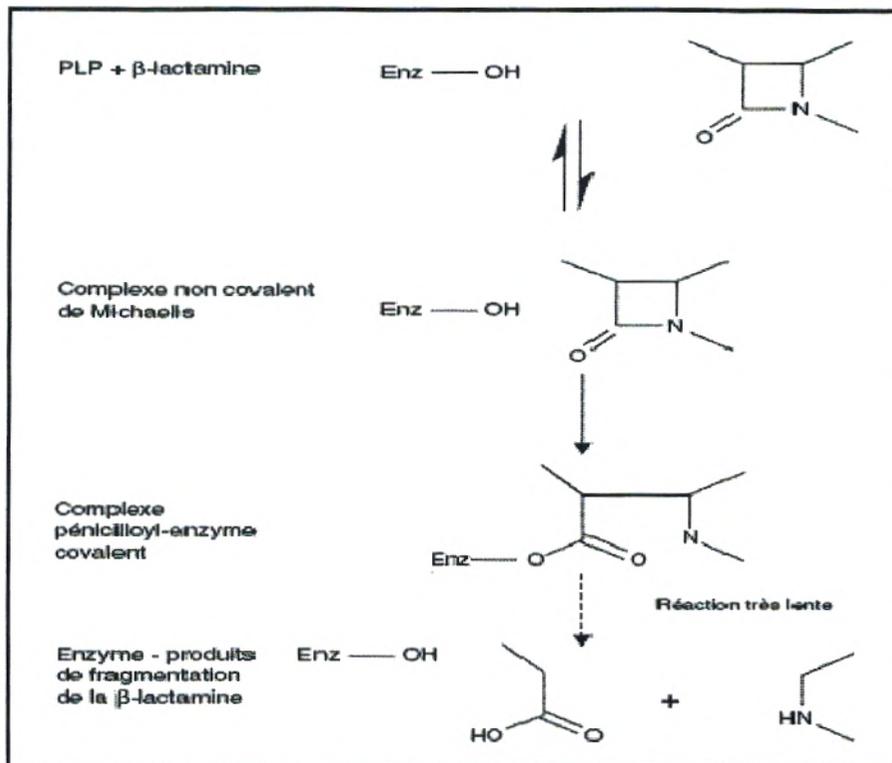
Les  $\beta$ -lactamines, inhibent la réaction de transpeptidation en se fixant de manière covalente au site actif des transpeptidases, désignées très souvent comme Protéines Liant la Pénicilline (PLPs) ou Penicillin-Binding Proteins (PBPs) (Charlier et al., 1998). Les PLPs sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de  $\beta$ -lactamines (Fisher et Merouch, 2005).

De part leur analogie structurale avec le D-alanyl-D-alanine (substrat naturel des PLP) (figure 4), les  $\beta$ -lactamines sont capables d'inhiber l'activité des DD-peptidases par acylation du résidu sérine du site actif des PLPs, formant ainsi un complexe covalent acylenzyme stable non catalytique (figure 5) (Van Hoof, 2001).



**Figure 4. Comparaison structurale entre le peptidoglycane et les antibiotiques  $\beta$ -lactames (De Wals, 2007).**

A : Structure générale de peptidoglycane retrouvé chez les procaryotes ; B : La structure de la benzylpénicilline.



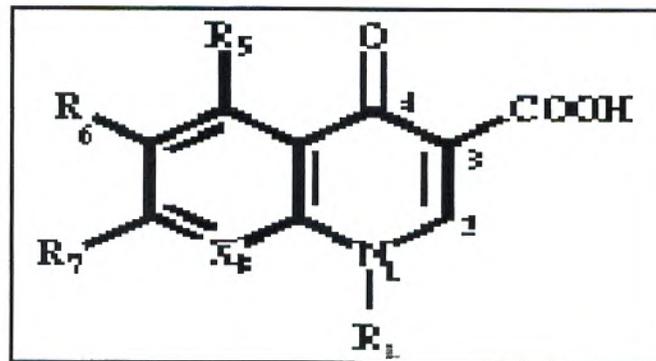
**Figure 5. Acylation du site actif d'une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) par une  $\beta$ -lactamine (Livermore, 1995).**

L'effet direct de l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane dû aux  $\beta$ -lactamines, est l'arrêt de la croissance bactérienne ou effet bactériostatique (Tankovic, 2000). Cependant, l'effet bactéricide résulte d'un phénomène secondaire déclenché par l'inhibition des PLPs. Il est initié par une altération du peptidoglycane qui induirait une activation dérégulée d'autolysines pariétales (muréine hydrolase et endopéptidase), conduisant à la lyse bactérienne (Bonnet, 2006).

## 2.2 Quinolones

Les quinolones sont une des trois principales familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine. Ce sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, chef de file des quinolones classiques longtemps indiquées dans le traitement des infections urinaires (Honoré et al., 2006). Toutes ces molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué et présentent une fonction cétone en 4 et un groupement carboxylique en 3 (figure 6) (Soussy, 2006). De nouveaux composés de cette

famille d'antibiotiques sont mis au point, dont certains additionnés d'un atome de fluor (norfloxacin, péfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin...) possèdent une activité plus étendue et ils sont plus indiqués dans le traitement des infections systémiques et tissulaires à bacilles à Gram négatif et à cocci à Gram positif (Nordmann, 2006).

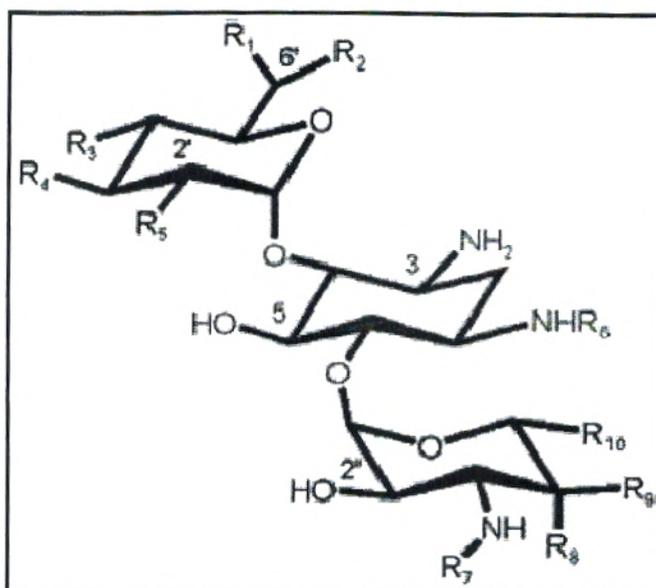


**Figure 6. Structure de base des quinolones (Tulkens et Spinewine, 2002).**

Après avoir pénétré à l'intérieur des cellules bactériennes par des protéines de perméabilité spécifique, les quinolones inhibent les topoisomérases de type II (gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication (Hooper, 2001), d'où l'inhibition de la synthèse de l'ADN et donc de la croissance bactérienne (Soussy, 2006). De plus, les coupures d'ADN double brin stabilisées par les quinolones constitueraient des lésions non réparables de l'ADN, capables de déclencher l'inactivation de certaines synthèses protéiques, responsable de la bactéricidie (Lewin et al., 1991).

### 2.3 Aminosides

Après avoir connu une certaine désaffection au profit des céphalosporines de troisième génération et des fluoroquinolones, les aminosides ont reconquis leur place d'antibiotique incontournable en milieu hospitalier (Lambert, 2006). Chimiquement ils sont constitués de plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol (figure 7) (Bismuth, 2006). Ce sont des cations, stables aux variations de température et de pH, très hydrosolubles, qui possèdent un large spectre antibactérien (Lambert, 1997).



**Figure 7. Structure de base des aminoglycosides les plus utilisés en clinique (Magnet et Blanchard, 2005).**

Le mécanisme d'action des aminoglycosides implique la liaison au site A de L'ARN ribosomal 16S. En effet, le site A est le siège de fixation de la plupart des aminosides à usage thérapeutique (Puglisi et al., 2000). Cette liaison inhibe l'appariement de l'ARNm au ribosome et empêche l'initiation de la traduction et peut aussi causer une mauvaise interprétation du code génétique conduisant à la synthèse de protéines "nonsens" (Roy, 2000).

Les aminosides peuvent en outre, s'accumuler de façon irréversible dans la cellule bactérienne, modifier la membrane cytoplasmique, altérer la synthèse de l'ADN ou dégrader l'ARN ou encore provoquer des désordres ioniques importants dans la cellule bactérienne (Lambert, 1997). Cette pléiotropie suggère que l'action des aminosides pourrait ne pas être limitée à la synthèse protéique, ce qui explique leur effet bactéricide (Doublet, 2004).

### 3. Mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques

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

Les mécanismes de résistance déployés par les entérobactéries à l'encontre des  $\beta$ -lactamines sont de quatre ordres, parfois plus ou moins associés : défaut de pénétration par imperméabilité de la paroi bactérienne, excrétion de la molécule antibiotique, défaut d'affinité pour la cible (PLP), mais la production d'enzymes inactivatrices ( $\beta$ -lactamases) est le principal mécanisme (Bonnet, 2006).

##### 3.1.1 Altération de la perméabilité membranaire

La membrane externe des entérobactéries est formée de lipopolysaccharide (LPS), dont la structure est hydrophile grâce à ses charges électriques de surface et très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (Pénicilline G, V et M, macrolides, rifampicine, acide fusidique et glycopeptides) (Nikaido, 1994).

La pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, s'effectue à travers des porines. Ces systèmes de transport passif qui constituent une grande famille de protéines de la membrane externe : OmpF, OmpC, OmpD, PhoE, LamB, OmpA, OmpK36 et Omp36, sont décrits chez *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Salmonella typhimurium* (Pagès et Garnotel, 2003). L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines (Livermore et Williams, 1996).

L'existence de porines qui seraient directement associées à la pénétration d'une classe particulière d'antibiotiques, n'est pas démontrée chez les entérobactéries. Il semble que les capacités de perméabilité membranaire plus élevées chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* et les paramètres physicochimiques des porines produites chez ces bactéries, n'aient pas amené l'intervention d'une porine spéciale pour le transport de molécules de  $\beta$ -lactamines particulières, à l'opposé de ce qui se produit chez *Pseudomonas aeruginosa*, où l'imipénème utilise de façon particulière la porine D2 (Livermore, 2001).

##### 3.1.2 Systèmes d'efflux

Les résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines liées à l'hyperexpression des systèmes d'efflux, n'ont été décrites que chez des bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, *P.*

*aeruginosa* ou *Neisseria gonorrhoeae* (Nikaido, 1998 ; Masuda et al., 2000 ; Veal et al., 2002). Ces systèmes expulsent des antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique (Poirel, 2006).

Chez *E.coli*, il existe 37 pompes d'efflux distinctes (Nishino et Yamaguchi, 2001). Toutefois, il semble qu'un petit nombre seulement de ces systèmes soit actif, dont AcrAB-TolC est le mieux caractérisé (figure 8). AcrB est la pompe, AcrA est la MFP (Membrane Fusion Protein) et TolC est une porine de la membrane externe (Borges-Walmsley et al., 2003).

### 3.1.3 Modification des protéines liant la pénicilline

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par altération des PLP a été décrite, mais ne semble pas être un mécanisme prédominant chez les entérobactéries. Ainsi, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1A (Neurwirth et al., 1995).

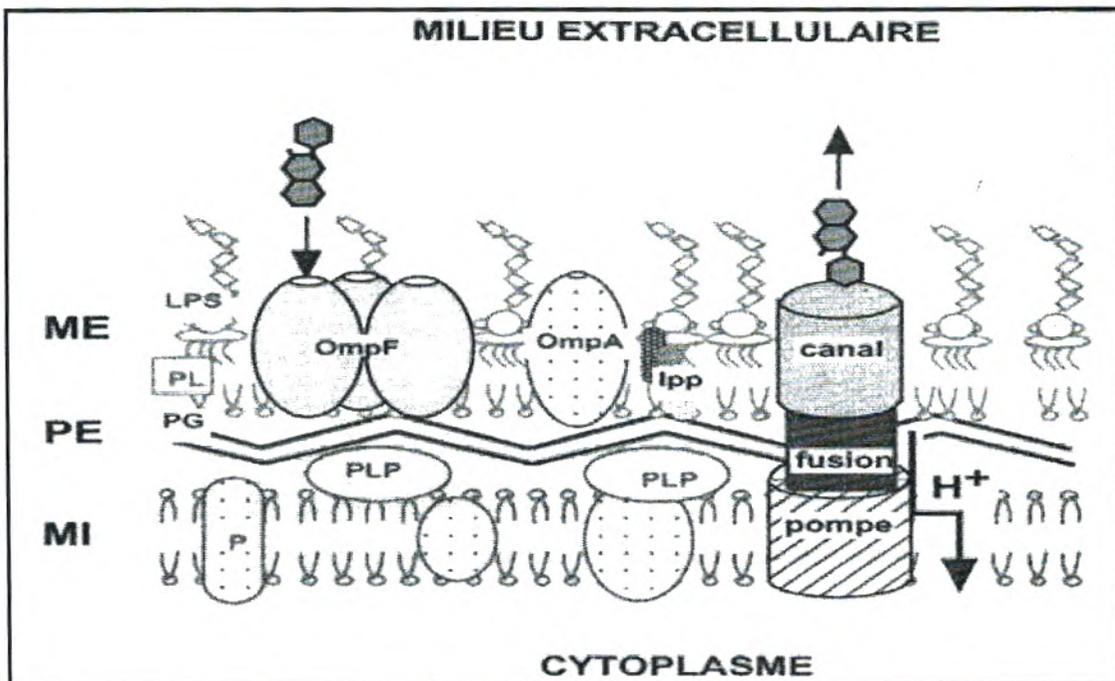


Figure 8. Enveloppe d'une bactérie à GRAM négatif, *Escherichia coli* (Pages et Garnotel, 2003).

MI : membrane interne ; PE : espace périplasmique ; ME : membrane externe ; lpp : lipoprotéines ; LPS : lipopolysaccharide ; PL : phospholipides ; PG : peptidoglycane ; OmpF : porine OmpF ; OmpA : protéine OmpA ; P : protéines ; PLP : protéines de liaison aux pénicillines. Mécanisme d'efflux : pompe AcrB ; fusion AcrA ; canal TolC.

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

Dans le cas des bacilles à Gram négatif, la résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame commun à cette classe d'antibiotiques. Les  $\beta$ -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide de cycle  $\beta$ -lactame (figure 9), donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (Matagne et al., 1998).

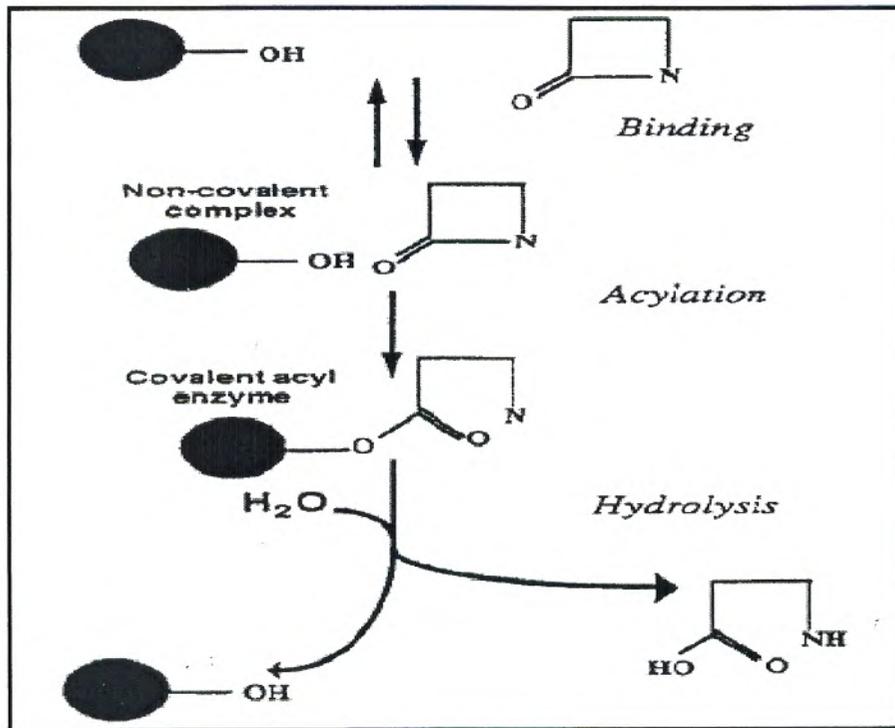


Figure 9. Action des  $\beta$ -lactamases (Livermore, 1995).

Sur le plan phylogénétique, ces  $\beta$ -lactamases dérivent des PLPs non essentielles à la vie bactérienne. On peut donc penser qu'au cours de l'évolution, ces PLPs ont structurellement évolué, afin d'acquérir une activité d'hydrolyse enzymatique beaucoup plus efficace sur les  $\beta$ -lactamines, sans perdre de leur affinité (Massova et Mobashery, 1998). Les gènes codant ces enzymes peuvent être de localisation chromosomique ou extra-chromosomique, portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons (Liassine, 2000). En outre, l'expression de ces gènes est constitutive ou inducible (Frère, 1995).

La diversité des  $\beta$ -lactamases a entraîné de nombreuses tentatives de classification. Deux sont actuellement utilisées (tableau 1). La première est la classification structurale d'Ambler (Ambler, 1980) qui est basée sur la séquence primaire en acides aminés d'éléments

conservés du site actif et qui divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (de A à D). Les groupes A, C et D contiennent des  $\beta$ -lactamases avec la sérine dans leur site actif. Par contre le groupe B contient des enzymes, comportant deux atomes de zinc au site actif, qui sont désignées comme métallo- $\beta$ -lactamases et peuvent hydrolyser les carbapénèmes (Nordmann et Poirel, 2002). La deuxième est la classification fonctionnelle de Bush qui repose sur l'activité hydrolytique des  $\beta$ -lactamases et leur sensibilité aux inhibiteurs (Bush et al., 1995).

**Tableau 1. Correspondance entre les classifications moléculaire et fonctionnelle des  $\beta$ -lactamases et résistances aux antibiotiques (Cavallo et al., 2004).**

Classification moléculaire (Ambler)	Classification fonctionnelle (Bush)	Type de $\beta$ -lactamase	Bactéries impliquées	Inhibition par l'acide clavulanique	$\beta$ -lactamines hydrolysées	$\beta$ -lactamines stables
Sérine $\beta$ -lactamases	2a	Pénicillines	Bactéries à Gram positif (dont staphylocoques et entérocoques)	++	Pénicillines sauf pénicillines M	Pénicillines M, C1G, carbapénèmes
Classe A	2b	$\beta$ -lactamases à large spectre	Bactéries à Gram négatif	++	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztréonam
	2be	$\beta$ -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztréonam	Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	Idem 2b + C3G et aztréonam	Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes
	2br	$\beta$ -lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique	Entérobactéries	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de $\beta$ -lase	Idem 2b
	2c	Carbénicillines	Bactéries à Gram négatif	+	Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinases inhibées par l'acide clavulanique	Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries)	++	Amino-, carboxy- et uréido-pénicilline, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztréonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibées par l'acide clavulanique	Entérobactéries	+	Idem 2b + aztréonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Enzymes AmpC chromosomiques et plasmidiques	Bactéries à Gram négatif	-	Toutes les $\beta$ -lactamines' sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillines	Bacilles à Gram négatif	+/-	Idem 2b (+ parfois C3G, aztréonam ou carbapénèmes)	Variable (voir texte)
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées n'entrant pas dans une autre catégorie	Espèces variées	-	Variable (voir texte)	Variable (voir texte)
Zinc $\beta$ -lactamases	3	Métallo- $\beta$ -lactamases	Bactéries à Gram négatif	-	Large profil de substrats dont les carbapénèmes	Variable
Classe B			<i>Bacillus</i> groupe <i>ceruus</i>			(surtout aztréonam chez les enzymes de type IMP ou VIM)

C1G : céphalosporines de première génération ; C2G : céphalosporines de deuxième génération ; C3G : céphalosporines de troisième génération.

### 3.1.4.1 Résistance enzymatique naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

Les entérobactéries produisent naturellement diverses  $\beta$ -lactamases chromosomiques (Livermore 1995), ce qui permet de les classer en sept groupes phénotypiques de résistance (Bonnet, 2006) :

- **Le groupe 0** : espèces dépourvues de  $\beta$ -lactamases et naturellement sensibles aux  $\beta$ -lactamines, comme *Salmonella spp* et *Proteus mirabilis*.
- **Le groupe 1** : c'est le cas d'*E.coli* et *Shigella spp* sensibles aux  $\beta$ -lactamines, mais qui produisent à un très bas niveau une céphalosporinase chromosomique, enzyme de type AmpC non inductible, qui peut entraîner chez certaines souches, une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations aux clavulanate et aux céphalosporines de première génération (Jarlier et Nordmann, 2000).
- **Le groupe 2** : espèces naturellement résistantes aux aminopénicillines et carboxypénicillines, du fait de la production à bas niveau des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de classe A, comme *K. pneumoniae* (SHV-1, LEN-1), *K. oxytoca* (OXY), *Citrobacter koseri* (CKO) et *Escherichia hermannii* (HER-1). Ce phénotype commun à ce groupe est souvent appelé « pénicillinase à bas niveau » (Jarlier et Nordmann, 2000).
- **Le groupe 3** : les entérobactéries appartenant à ce groupe, réunissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C (AmpC) chromosomiques et inductibles par certaines  $\beta$ -lactamines (céfoxitine, imipénème, clavulanate). C'est le cas de nombreuses espèces, essentiellement des saprophytes, responsables d'infections nosocomiales (Jarlier et Nordmann, 2000) comme *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *Serratia spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans*. Le phénotype décrit pour ces espèces, souvent appelé « céphalosporinase de bas niveau », comprend une résistance aux aminopénicillines ainsi qu'à leurs associations aux  $\beta$ -lactamines inhibitrices et aux céphalosporines de première génération (Gardien et al., 1997).
- **Le groupe 4** : espèces résistantes aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux céphalosporines de première génération, comme *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola*. Ce phénotype particulier est déterminé par la production naturelle de deux  $\beta$ -lactamases chromosomiques, l'une inductible à activité céphalosporinase et l'autre constitutive à faible activité pénicillinase (Seoane et Garcia Lobo, 1991, Seoane et al., 1992).

- **Le groupe 5 :** c'est le cas de *Proteus vulgaris* et *P. penneri* qui produisent naturellement des céphalosporinases inductibles de classe A, souvent appelées céfuroximases. Ces enzymes ne sont pas inhibées par la cloxacilline au contraire des céphalosporinases produites par les espèces de 3<sup>ème</sup> groupe. Elles confèrent une résistance aux aminopénicillines, aux C1G, aux C2G (céfuroxime, céfamondole) à l'exception des céphamycines et une sensibilité aux associations  $\beta$ -lactamines-inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (**Jarlier et Nordmann 2000**).
- **Le groupe 6 :** les espèces *Kluyvera ascorbata*, *K. cryocrescens*, *K. georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) de classe A. Ces BLSE, souvent exprimées à bas niveau, confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G à l'exception des céphamycines. Par contre, la résistance aux uréïdopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Pour les espèces appartenant à ce groupe, une synergie est observée entre les C1G, C2G et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (**Philippon et Arlet, 2006**).

### 3.1.4.2 Résistance enzymatique acquise des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

Ce phénomène est lié à trois mécanismes principaux : l'hyperproduction enzymatique, l'élargissement du spectre d'enzymes « anciennes » par mutations ponctuelles et la mobilisation des gènes de résistance grâce à divers éléments génétiques mobiles (**Gautier, 2007**).

- **Pénicillinases haut niveau ou « pénicillinases acquises » :** ce phénotype est dû à la production plasmidique de  $\beta$ -lactamases à large spectre, comme TEM-1 ou TEM-2 et SHV1 qui peuvent être hyperproduites et confèrent la résistance aux aminopénicillines, carboxypénicillines,  $\beta$ -lactamines en association avec les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (de type acide clavulanique) et aux céphalosporines de première et deuxième génération (**Messai et al., 2006**). Les  $\beta$ -lactamases TEM-1 et SHV-1 sont fréquemment produites par les entérobactéries comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (**Dubouix et Marty, 2004**).

- **Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs (TRI) :** ce phénotype est lié à la production d'enzyme de type TEM-1 ayant subi une modification ponctuelle au niveau d'un ou de plusieurs acides aminés (**Blazquez et al., 1993**). Cela aboutit à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, d'où l'appellation « phénotype TRI » (TEM résistantes aux inhibiteurs). Ce phénotype est fréquemment observé chez *E. coli*, *Proteus* et *Klebsiella* et confère une résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline, seules ou en

association avec l'acide clavulanique et un bas niveau de résistance aux C1G (**Lavigne et al., 2002**).

•  **$\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)** : les BLSE sont des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler. Elles hydrolysent aussi bien les pénicillines que les céphalosporines (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone...) et les monobactames. Les céphamycines (céfotétan, latamoxef) et les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème) restent actifs, alors que les activités des céphalosporines de quatrième génération (céfépime, cefpirome) et celles des associations  $\beta$ -lactamines/inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont variables (**Adjidé et al., 2006**). Pour les souches productrices de BLSE, il en résulte une synergie remarquable entre les C3G inactivées et l'acide clavulanique, ce qui est à la base du test de synergie utilisé pour détecter les souches de ce phénotype (**Philippon et Arlet, 2006**).

Plus de 200 BLSE sont décrites (**Livermore et Woodford, 2006**) et sont en général portées par des plasmides et des transposons (**Tenover, 2006**). La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des  $\beta$ -lactamases TEM-1 et SHV-1, mais de nombreuses enzymes non apparentées ont été décrites (OXA, CTX-M, PER, VEB, GES, BES, TLA, SFO et IBC) (**Bradford, 2001; Paterson et Bonomo, 2005**).

Les CTX-M représentent le groupe de BLSE le plus rencontré chez les entérobactéries. Inversement aux profils des BLSE de types TEM et SHV, ces enzymes dérivent des gènes ancestraux de  $\beta$ -lactamases chromosomiques de différentes espèces du genre *Kluyvera* (**Bonnet, 2004**). Il existe plus de 75 types de  $\beta$ -lactamases CTX-M ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)), répartis en cinq grands groupes en fonction des similitudes de leurs séquences en acides aminés (CTX-M-1, M-2, M-8, M-9 et M-25) (**Iabadene et al., 2009**). Ces enzymes ont communément une activité préférentielle sur le céfotaxime et la ceftriaxone par rapport à la ceftazidime (**Bonnet, 2004**), à l'exception d'enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27) qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). De plus, les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique (**Bonnet, 2004**).

Dans la majorité des isolats cliniques, les CTX-M sont codées par des plasmides de 60 à 160 kb, au sein desquels coexistent fréquemment des gènes codant pour d'autres  $\beta$ -lactamases. La dissémination horizontale des gènes codant les CTX-M, s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion IEScp1 (**Walther-Rasmussen et Hoiby, 2004**).

• **Hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques « CASE haut niveau » :** certaines souches d'entérobactéries (groupe 3, *E. coli*, *Shigella spp*), peuvent par mutation chromosomique devenir hyperproductrices de la céphalosporinase naturelle. Ce phénotype dénommé céphalosporinase déréprimée, s'individualise par une résistance à diverses  $\beta$ -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les C3G ou encore l'aztréonam et par une absence de synergie avec l'acide clavulanique (**Arlet et Philippon, 2003**). Le mécillinam, les C4G (céfépime, ceftiofime) et les carbapénèmes gardent leur activité sur les souches présentant ce phénotype (**Philippon et Arlet, 2006**);

La régulation de l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC inductible, fait intervenir les gènes *ampR*, *ampD*, *ampG* et les mécanismes de recyclage du peptidoglycane (**Gautier, 2007**). Les mécanismes essentiels sont des mutations dans le gène *ampR* et dans le gène *ampD*. Ces mutations provoquent l'accumulation de muropeptides dans le cytoplasme et aboutissent à une transformation de la protéine AmpR (répresseur de gène *ampC*) en activateur permanent et stable du gène *ampC*, suivie d'une hyperproduction continue et transmissible à la descendance de la céphalosporinase AmpC (**Jones et al., 1997; Goldstein, 2003**). Pour les espèces qui produisent une céphalosporinase de manière constitutive, l'hyperproduction de cette enzyme nécessite des événements génétiques spécifiques, puisque le gène *ampR* est absent. En effet, chez *E. coli* et *Shigella spp* la résistance par hyperproduction de céphalosporinase peut être due à l'acquisition d'un promoteur fort, apporté par des séquences d'insertion (**Nelson et Elisha, 1999**).

• **Céphalosporinases plasmidiques :** le phénotype "céphalosporinase haut niveau" peut résulter de l'acquisition d'un gène *ampC* plasmidique (**Philippon et al., 2002**). Les céphalosporinases plasmidiques sont très proches génétiquement des céphalosporinases chromosomiques. Le premier exemple d'*ampC* plasmidique découvert en 1987, est celui de MIR-1 chez *K. pneumoniae* aux États-Unis (**Papanicolau et al., 1990**). Depuis, plusieurs céphalosporinases transférables ont été mises en évidence chez les entérobactéries (**Rhimi-Mahjoubi et al., 2002; Mirò et al., 2005; Ben Achour et al., 2007; Ding et al., 2008; Iabaden et al., 2009**).

• **Résistance aux carbapénèmes :** chez les entérobactéries, cette résistance est principalement due à deux mécanismes impliquant des  $\beta$ -lactamases. Le premier associe la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE à une diminution de perméabilité membranaire par perte ou altération de porines et se traduit par une diminution de l'activité de nombreuses  $\beta$ -lactamines y compris l'imipénème. Ce phénotype a été décrit chez *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* et *Citrobacter freundii*

(Mainardi et al., 1997). Le second mécanisme met en jeu des  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser fortement les carbapénèmes et nommées carbapénémases (Cuzon et al., 2010).

Les carbapénémases décrites chez les entérobactéries sont soit des métallob- $\beta$ -lactamases, soit des oxacillinases à spectre étendu, soit des carbapénémases dont l'activité est inhibée par l'acide clavulanique (Queenan et Bush, 2007). Les métalloenzymes sont essentiellement des enzymes de type IMP ou VIM responsables d'épidémies hospitalières sévères dans certains pays (Loli et al., 2006). Ces enzymes hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztréonam. L'oxacillinase OXA-48 a été décrite majoritairement chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* (Carrër et al., 2008; Matar et al., 2008). Enfin, les carbapénémases inhibées par l'acide clavulanique, peuvent être soit codées par des gènes chromosomiques (SME, NMC-A, IMI et SFC-1) (Philippon et Arlet, 2006), soit codées par des gènes plasmidiques comme certains variants de GES et *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Ces dernières, sont les plus répandues chez les entérobactéries, confèrent une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, possèdent un pouvoir de dissémination important et elles sont émergentes dans de nombreux pays (Nordmann et al., 2009).

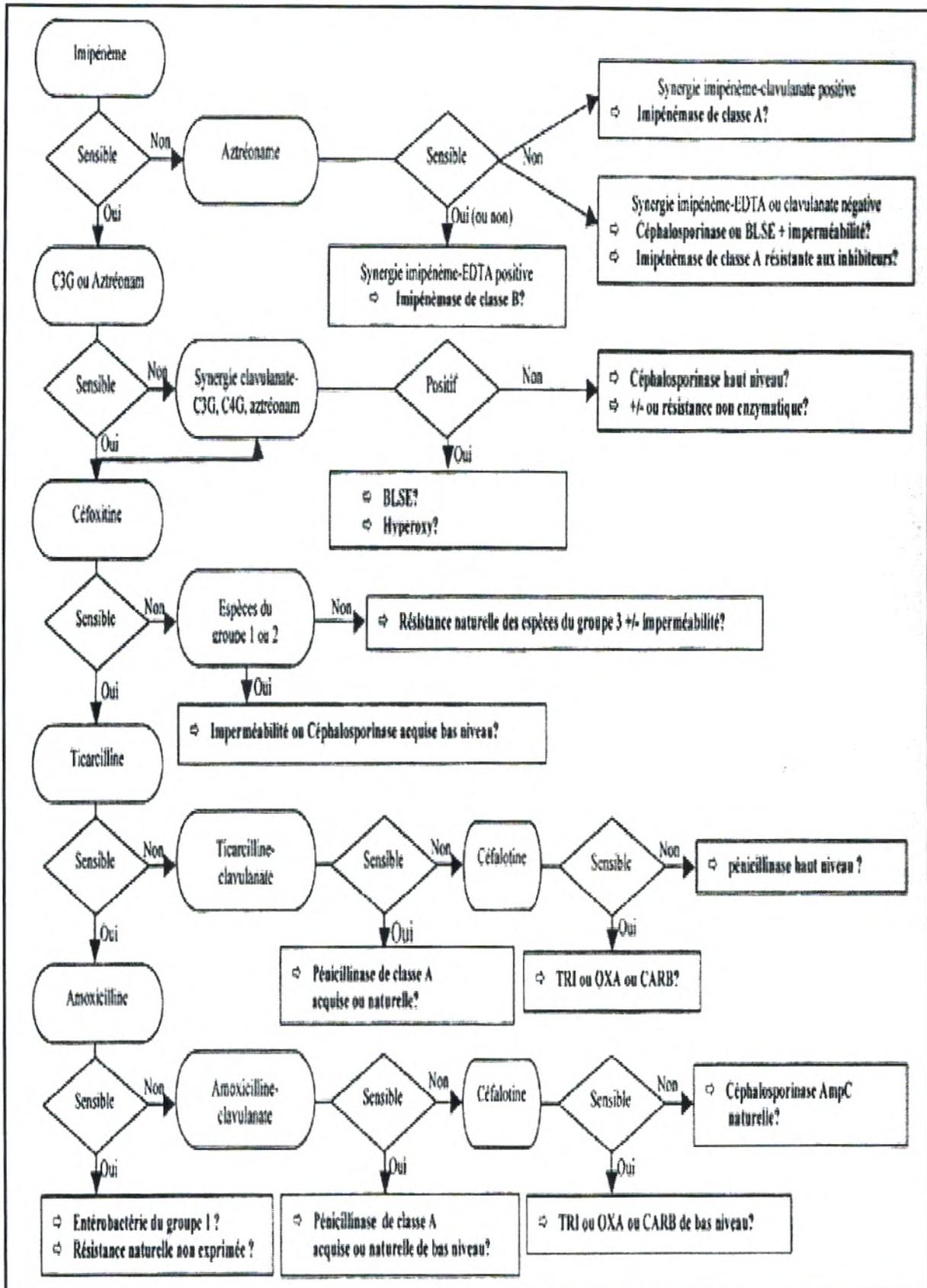


Figure 10. Arbre décisionnel permettant d'inférer les mécanismes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (Bonnet, 2006).

### 3.2 Résistance aux quinolones

Les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications des cibles, les topoisomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques, par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (Hooper, 2001). Les déterminants de ces mécanismes de résistance sont chromosomiques et ne sont pas associés à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Nordmann, 2006).

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique, jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez et al, ont décrit la première souche *Klebsiella pneumoniae* dont le support de la résistance est un plasmide transférable (Martinez-Martinez et al., 1998). Le déterminant génétique de cette résistance est le gène « qnr » dont la caractéristique est d'être porté par différents types d'intégrons. L'importance de ce support est sa transférabilité et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux quinolones (Guessennd et al., 2008). La protéine qnr s'intercale entre les topo-isomérases de type IV et II (gyrase) et les quinolones, bloquant ainsi leur activité antibiotique (Tran et Jacoby, 2002 ; Tran et al., 2005). Depuis la résistance plasmidique aux quinolones a été rapportée dans le monde, les gènes qnr ont été identifiés dans différentes espèces d'entérobactéries et sont souvent associés à la production de  $\beta$ - lactamases à spectre étendu (Guessennd et al., 2008). Récemment, un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches d'*Escherichia coli* isolées en Chine. Il s'agit d'une inactivation de ces antibiotiques par acétylation. Le déterminant de cette résistance est un variant d'une aminoside N-acétyltransférase ACC-(6')-Ib-cr (Park et al., 2006).

### 3.3 Résistance aux aminosides

L'inactivation enzymatique des aminoglycosides est le type de résistance le plus fréquemment observé en clinique (Wright, 2008). Les enzymes modificatrices des aminosides ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent : acétylation d'un groupement aminé [N-acétyltransférase (AAC)], phosphorylation ou nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-phosphotransférase (APH), O-nucléotidyltransférase (ANT)] (Lambert, 2006). Les gènes codant ces enzymes sont portés principalement par des plasmides et/ou des transposons, permettant une diffusion horizontale entre espèces (Faure, 2009). Parmi ces enzymes, les plus répandues chez les entérobactéries sont : APH(3')-Ia, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, AAC(6')-Ib, AAC(3)-Ia, ANT(2'')-Ia (Wright, 2008).

## **1. Matériel**

### **1.1 Matériel biologique**

#### **1.1.1 Souches étudiées**

Un total de 112 souches appartenant à la famille des entérobactéries, isolé entre octobre 2008 et juin 2009 de différents services du CHU de Tlemcen, a fait l'objet de notre étude.

#### **1.1.2 Souches de références**

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* K12 Rif R
- *Escherichia coli* V517

### **1.2 Milieux de culture**

#### **1.2.1 Milieux de culture liquides**

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

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

- Mac Conkey
- Gélose nutritive
- Mueller Hinton
- T.S.I

### **1.3 Tests biochimiques**

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

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

- Tampon phosphate 0.5 M pH 7
- Solution iodo-iodurée
- Tampon TE
- Solution de lyse
- Phénol-Chloroforme-Isoamylalcool (24 : 25 : 1) (Sigma)

#### **2.4.2 Test d'oxydase (Marchall et al., 1991)**

Ce test est réalisé en ajoutant un disque imprégné d'oxalate N-diméthylphénylène-diamine à une suspension bactérienne dense en eau physiologique. Ce réactif s'oxyde au contact du cytochrome des bactéries oxydase positive. La réaction d'oxydation se traduit par une coloration violette foncée en deux minutes environ.

#### **2.4.3 Galerie API 20 E**

La galerie API 20 E est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

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

#### **2.5. Conservation des souches**

Les souches sont conservées à 4 C° dans des tubes de gélose inclinée ou dans des tubes de gélose profonde.

#### **2.6. Détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques**

##### **2.6.1. Antibiogramme (Vedel, 1998; CA-SFM, 2008)**

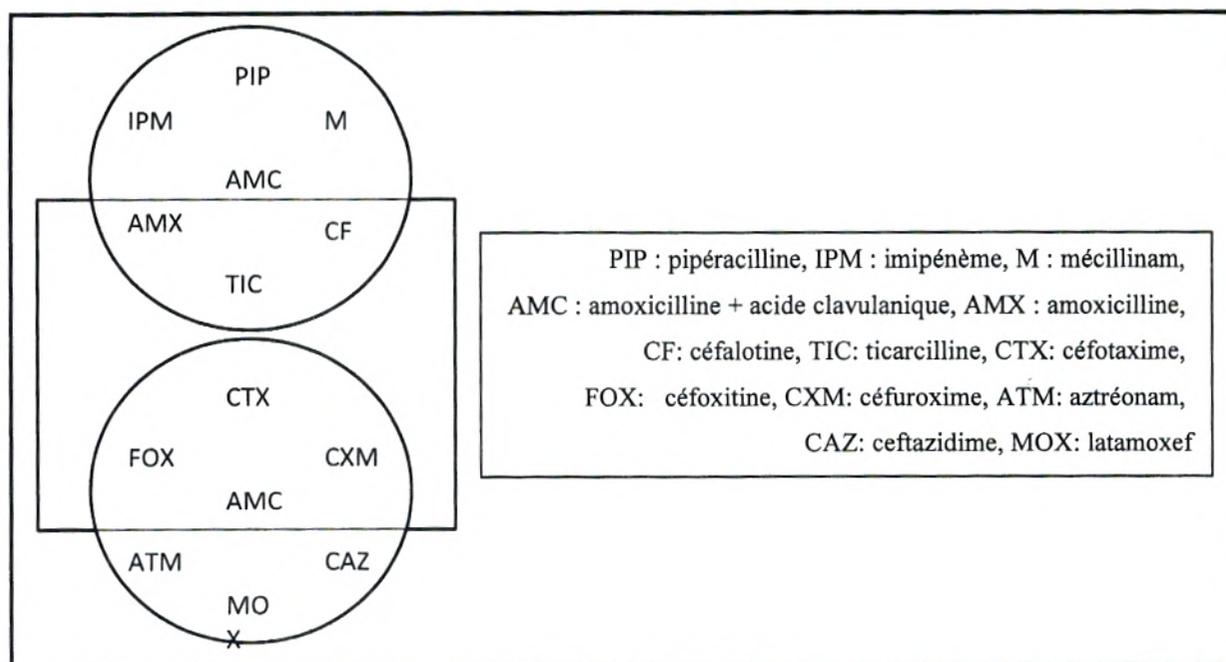
- **Principe**

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

- **Technique**

La technique utilisée est la méthode de diffusion des antibiotiques en milieu solide (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2008).

- A partir d'une culture bactérienne de 24 h sur milieu gélosé, réaliser une suspension en ensemençant une colonie dans 5 ml de BHIB, incuber 24 h à 37°C
  - calibrer la densité optique (DO) de la culture obtenue à une DO de 0,08-0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à 10<sup>8</sup> UFC/ml
  - A partir de cette culture, effectuer une dilution au 1/100 (≈10<sup>6</sup> UFC/ ml) dans de l'eau physiologique
  - Ensemencer par inondation, les boîtes de Pétri préalablement coulées par 20 ml de milieu Mueller Hinton, bien agiter puis enlever le surplus
  - Sécher les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37 C°
  - Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile.
- Pour ce qui concerne les β-lactamines, placer les disques dans un ordre qui obéit au schéma de Vedel (figure 11).



**Figure 11. Schéma de Vedel (Vedel, 1998).**

• **Lecture**

- Après 18 à 24 heures d'incubation, mesurer les diamètres d'inhibition en se référant aux valeurs critiques publiées par le CA-SFM (2008) (Annexe 3)
- Interpréter les phénotypes de résistance aux β-lactamines.

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

#### • Principe

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

#### • Technique

##### Préparation du gel

- Dissoudre, par chauffage jusqu'à ébullition, 0.3 g d'amidon et 0.8 g d'agarose dans 50 ml de tampon phosphate 0.5 M pH 7
- Refroidir la solution au bain Marie à une température de 55 C°
- Ajouter 1,2 ml de solution iodo-iodurée et 30 mg de pénicilline G
- Bien mélanger, verser dans des boîtes de Pétri puis laisser solidifier
- Réaliser des puits de 4 à 5 mm de diamètre, séparés d'environ 3 cm.

##### Préparation de la suspension bactérienne

- A partir d'une culture bactérienne de 18 heures sur milieu gélosé, mettre en suspension 4 à 5 colonies dans 0.5 ml d'eau physiologique, puis vortexer.

##### Ensemencement

- Remplir les puits avec 20  $\mu$ l de la suspension bactérienne préparée extemporanément.

#### • Lecture

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

### 2.6.3 Test à la cloxacilline (De champs et al., 2002)

#### • Principe

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

#### • Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant de la cloxacilline, à une concentration finale de 250  $\mu$ g/ml (Giraud-Morin et Fosse, 2008).

- **Lecture**

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

#### **2.6.4 Test de synergie**

- **Principe**

La détection phénotypique de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, est basée sur la mise en évidence d'une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique (Philippon et Arlet, 2006).

- **Technique**

Sur une gélose Mueller Hinton préalablementensemencée par la souche à tester, appliquer des disques de céfotaxime (30 $\mu$ g), ceftazidime (30 $\mu$ g) et aztréonam (30 $\mu$ g) à une distance de 2 cm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (20 $\mu$ g/10 $\mu$ g) (Jarlier et al., 1988).

- **Lecture**

La positivité de ce test est matérialisée par un aspect dit « bouchon de champagne » (Sirot, 1996).

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

- **Principe**

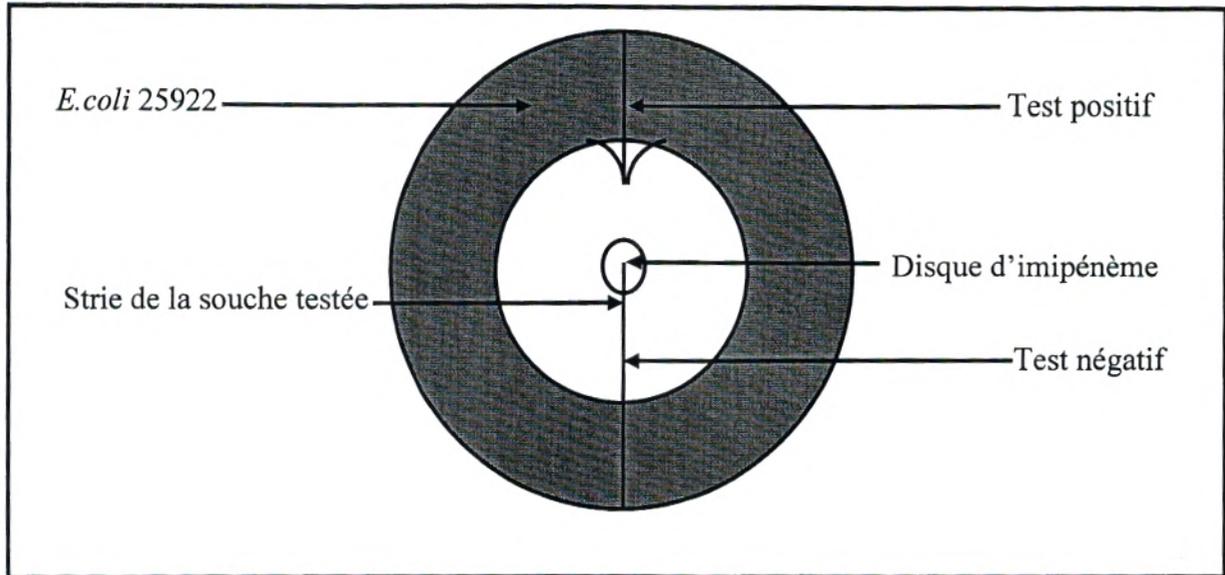
Il consiste à mettre en évidence l'hydrolyse de l'imipénème à l'aide d'une bactérie indicatrice sensible (*Escherichia coli* ATCC 25922)

- **Technique**

- Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mac Conkey par une suspension d'*E.coli* (ATCC 25922) de 10<sup>8</sup> UFC/ml
- A partir d'un bouillon de 24 h de la souche à tester, faire une lourde strie du centre de la boîte vers la périphérie
- Sécher les boîtes 15 minutes à l'étuve
- Déposer un disque d'imipénème au centre de la boîte (à l'extrémité de la strie)
- Incuber 18 heures à 37 C°.

• **Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche testée se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche indicatrice *E. coli* ATCC 25922 (figure12).



**Figure 12. Test de Hodge.**

**2.7 Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 2008)**

• **Principe**

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

• **Technique**

**Préparation des solutions d'antibiotiques**

Pour chacun des antibiotiques testés, préparer une solution mère à 5120 µg/ml puis réaliser des dilutions en série de progression géométrique de raison 1/2 (Annexe 4).

**Préparation des boîtes**

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton gélosé maintenu en surfusion
- Bien mélanger et laisser solidifier

- Sécher les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37° C.

#### **Préparation de l'inoculum**

- A partir des cultures de 18 heures, préparer des suspensions de  $10^8$  UFC/ ml pour chacune des souches à tester
- Diluer la suspension au 1/10 ( $\approx 10^7$  UFC/ ml) dans de l'eau physiologique

#### **Ensemencement**

- Ensemencer par spot 1 à 2  $\mu$ l de la suspension bactérienne, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

#### **Incubation**

- Incuber 18 à 24 heures à 37° C.

#### **• Lecture**

La concentration minimale inhibitrice, est la plus faible concentration d'antibiotique où il n'y a pas de croissance bactérienne visible.

## **2.8 Détermination de support génétique de la résistance aux antibiotiques**

### **2.8.1 Conjugaison bactérienne (Touati et al., 2006)**

#### **• Principe**

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

#### **• Technique**

- Ensemencer la souche réceptrice (*E.coli* K 12) et les souches donatrices en bouillon nutritif et incuber 18 à 24 heures à 37° C
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1/10
- Mélanger doucement par inversement
- Incuber 18 à 24 heures
- Préparer les boîtes de sélection en incorporant à une gélose Mac Conkey, 1 ml du céfotaxime et 1 ml de la rifampicine à des concentrations finales de 8  $\mu$ g/ml et 256  $\mu$ g/ml respectivement

- Sécher les boîtes 30 min à 37° C
- Ensemencer par épuisement le mélange sur une partie de la boîte de sélection
- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant par spot la souche donatrice et la souche réceptrice sur la même boîte
- Incuber 24 heures à 37° C.

• **Lecture**

Sur les boîtes de sélection, la souche donatrice et la souche réceptrice ne doivent pas se développer, seules les transconjugants résistants à la fois à la rifampicine et au céfotaxime sont capables d'y croître. Ces transconjugants doivent être analysés en réalisant des antibiogrammes.

### **2.8.2. Extraction de l'ADN plasmidique (Kado et liu, 1981-modifié)**

• **Principe**

Cette technique est basée sur la lyse bactérienne, par un traitement par du SDS alcalin combiné à la chaleur, suivie d'une élimination des contaminants majeurs (protéines, ADN chromosomique, ARN de haut poids moléculaire et débris cellulaires) par des solvants organiques.

• **Technique**

- Réaliser une culture bactérienne dans 5 ml de LB et incuber 24 heures à 37 C°
- Centrifuger 3 ml de culture à 14000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante
- Jeter le surnageant et sécher le culot
- Ajouter 100 µl de TE, bien vortexer
- Ajouter 200 µl de solution de lyse
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Incuber sous agitation à 55 C° pendant 30 minutes
- Ajouter 600 µl de phénol-chloroforme-isoamylalcool (24 : 25 : 1)
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 minutes
- Récupérer délicatement la phase supérieure qui correspond à l'ADN plasmidique dans un nouveau microtube.

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

#### • Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les molécules chargées selon leurs poids moléculaires et leurs conformations. Sous l'application d'un champ électrique, les acides nucléiques étant chargés négativement, vont migrer vers l'anode. Les petites molécules seront moins retenues dans le gel que les grosses molécules, ce qui leur permettra de migrer plus rapidement.

#### • Technique

##### **Préparation du gel d'agarose**

- Pour un gel de 0,8 %, dissoudre par chauffage jusqu'à ébullition, 1,6 g d'agarose (Sigma) dans 200 ml de tampon TBE 1 fois dilué.
- Laisser refroidir, puis couler le gel dans un moule où le peigne est préalablement déposé
- Laisser solidifier, retirer le peigne, puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse
- Ajouter un volume de tampon TBE 1X dans la cuve jusqu'à ce que le gel soit immergé.

##### **Ensemencement**

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

##### **Migration**

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

##### **Révélation**

- Colorer le gel en l'immergeant dans une solution de TBE 1X contenant du BET à une concentration de 0.5 µg/ml pendant 30 à 45 minutes à température ambiante
- Placer le gel dans un transilluminateur.

## 1.2 Souches identifiées

Sur un total de 234 bacilles à Gram négatif, ont été identifiées 112 entérobactéries (figure 13), ce qui correspond à une fréquence d'isolement de 43,6% (112/257). Il est nécessaire de préciser que 107 souches ont été isolées à partir de patients (107/194), soit 55.1% et 5 à partir de l'environnement (5/63), soit 7.9%.

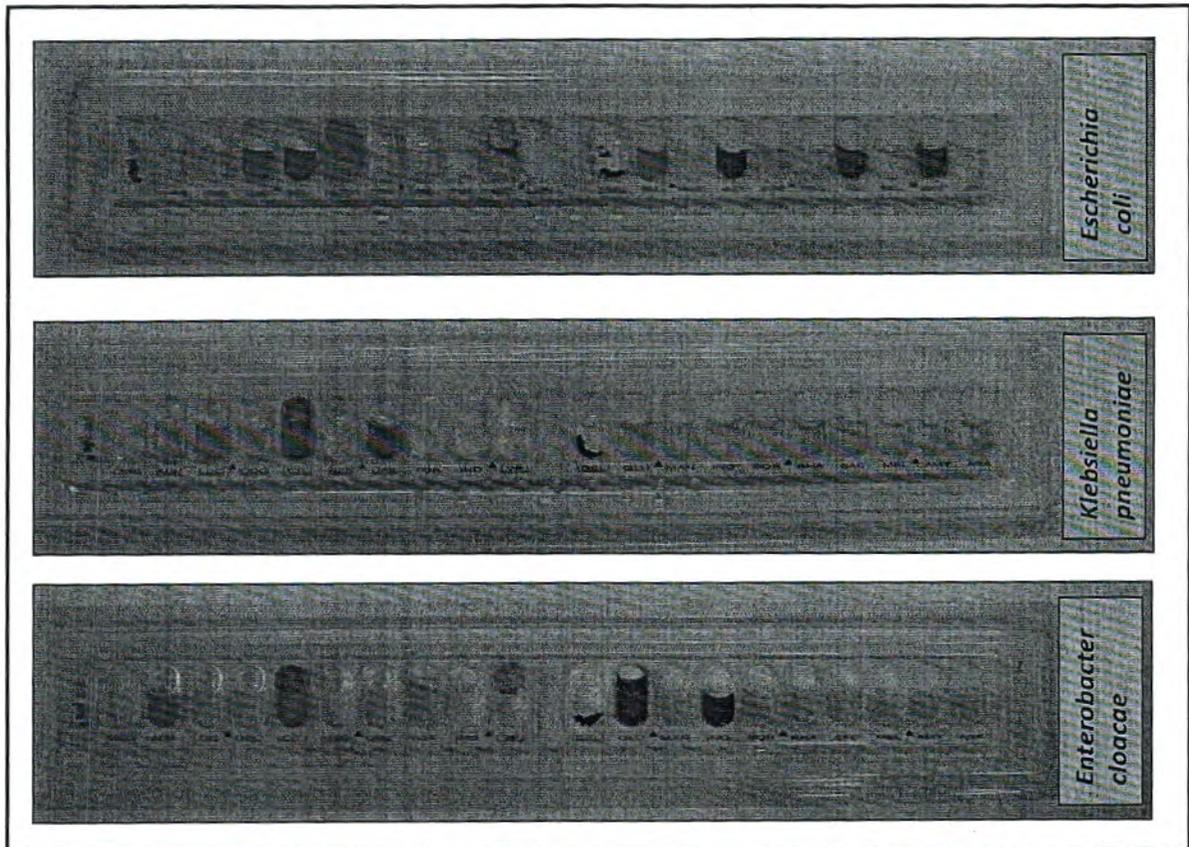


Figure 13. Identification des principales espèces par galerie API 20E.

Par rapport au total de souches d'entérobactéries étudiées, *Escherichia coli* occupe la première place avec 45 souches (40.2%), suivie de 44 *Klebsiella pneumoniae* (39.3%) et 14 *Enterobacter cloacae* (12.5%) (figure 14). Viennent ensuite les autres entérobactéries avec 9 isolats (8%), dont 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Citrobacter koseri*, 1 *Citrobacter freundii*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Escherichia fergusonii*, 1 *Pantoea spp* et 1 *Serratia marcescens*.

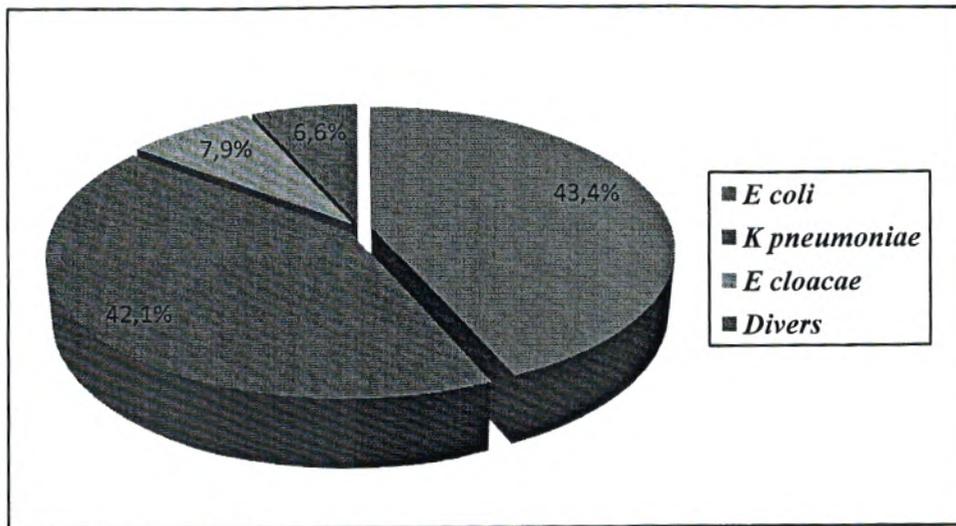


Figure 15. Répartition des entérobactéries au service de réanimation.

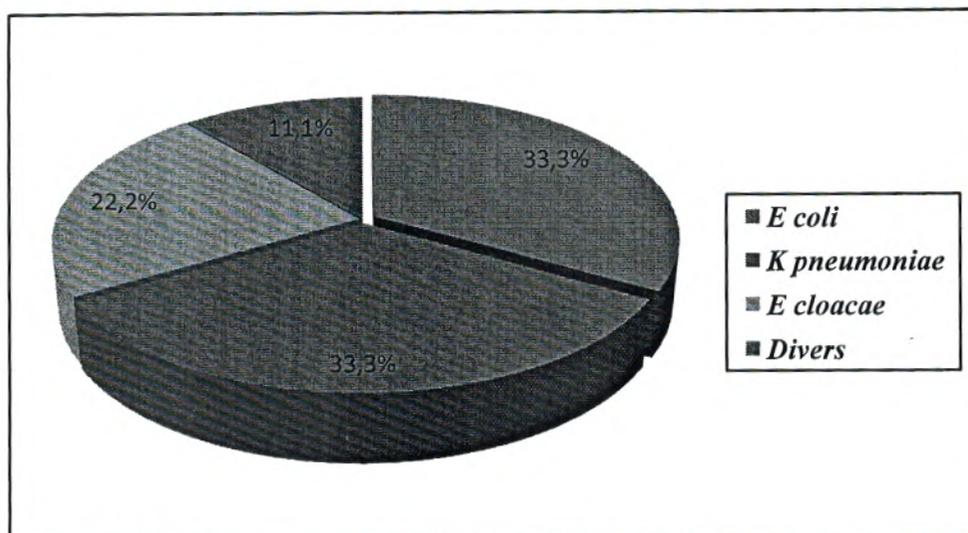


Figure 16. Répartition des entérobactéries au niveau des autres services.

### 1.2.2 Répartition des entérobactéries en fonction des sites de prélèvement

La répartition des espèces étudiées diffère selon les types de prélèvement (annexe 8). En effet, pour les prélèvements rectaux (figure 17) et les plaies chirurgicales (figure 18), les résultats révèlent qu'*Escherichia coli* est l'espèce prédominante avec respectivement des taux de 53.7% (22/41) et 35.3% (12/34). Par contre, au niveau des prélèvements trachéaux (figure 19), c'est *Klebsiella pneumoniae* qui prédomine avec un taux de 51.9% (14/27). Enfin, Pour *Enterobacter cloacae* le taux d'isolement à partir de plaies chirurgicales est plus important par rapport aux autres types de prélèvement avec 23.5% (8/34).

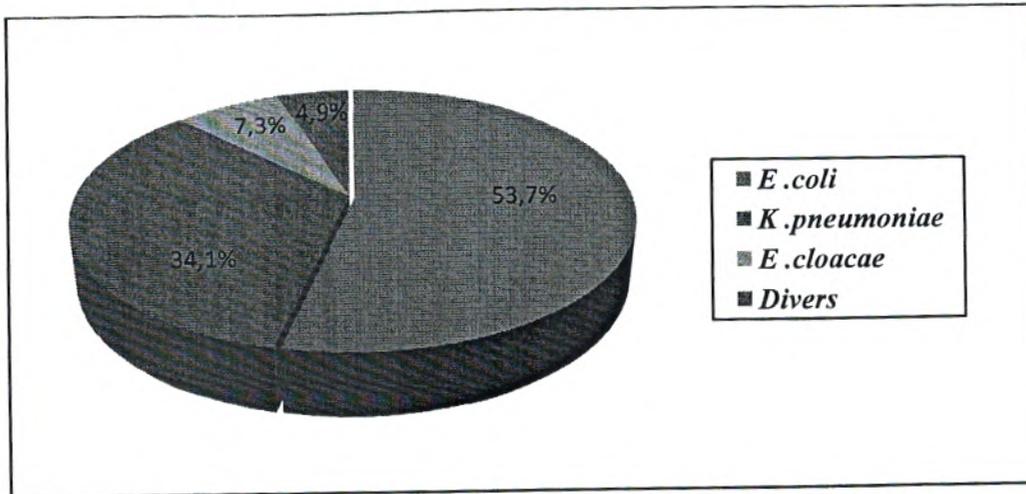


Figure 17. Répartition des entérobactéries au niveau des prélèvements rectaux.

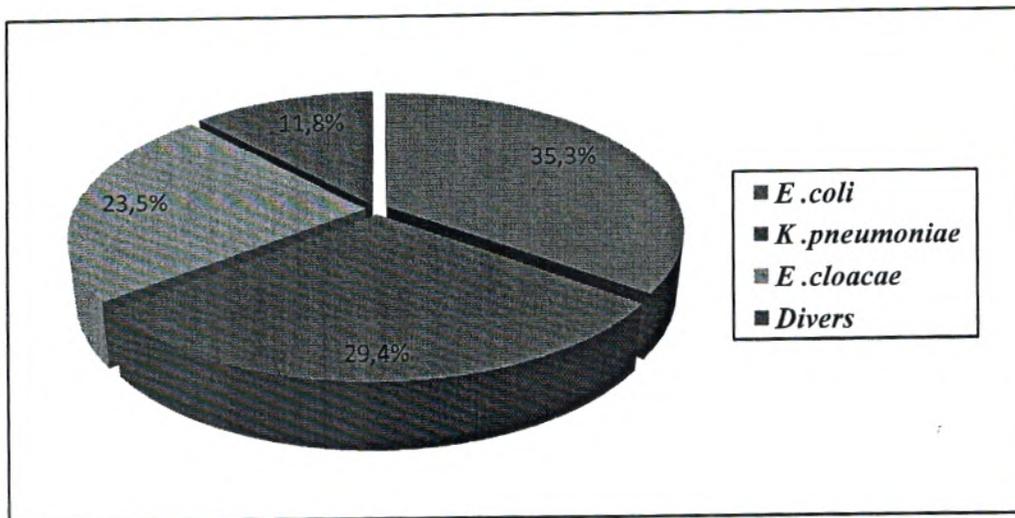


Figure 18. Répartition des entérobactéries au niveau des plaies chirurgicales.

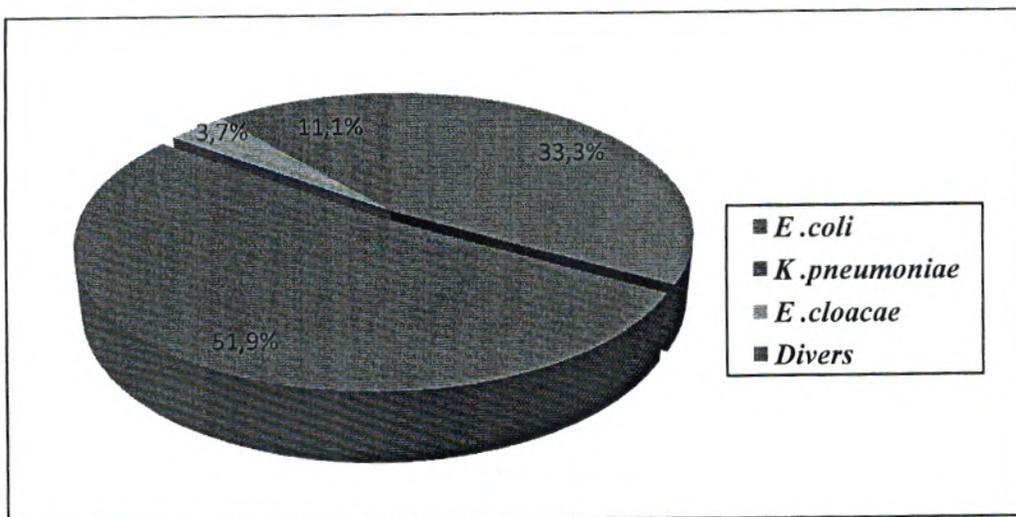


Figure 19. Répartition des entérobactéries au niveau des prélèvements trachéaux.

amikacine (6.7%). Pour les quinolones, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine présentent respectivement des taux de résistance de 71% et 57,8%. Notons également un taux de résistance de 60% pour la triméthoprime/sulfaméthoxazole et seulement 6.7% pour la colistine.

### 1.3.2 Résistance de *Klebsiella pneumoniae*

Pour *Klebsiella pneumoniae* (figure 22), sont notés des taux de résistance très élevés avec la plupart des antibiotiques testés : amoxicilline, ampicilline et ticarcilline (100%), amoxicilline + acide clavulanique (86.4%), ampicilline + sulbactam et ticarcilline + acide clavulanique (90.9%), pipéracilline et mezlocilline (88.6%), céfalotine (90.9%), ceftriaxone et céfotaxime (86,4%), ceftazidime (90.9%), aztréonam (84.1%), gentamicine (86.4%), tobramycine (88.6%), acide nalidixique (92.7%), ciprofloxacine (81.8%) et triméthoprime/sulfaméthoxazole (88.6 %). Les taux de résistance les plus faibles sont observés avec pipéracilline + tazobactam (38.6%), céfoxitine (13.6%), amikacine (4.5%) et colistine (2.3%).

La résistance totale des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux aminopénicillines (amoxicilline et ampicilline) et aux carboxypénicillines (ticarcilline), est expliquée par leur résistance naturelle à ces antibiotiques (Jarlier et Nordmann, 2000).

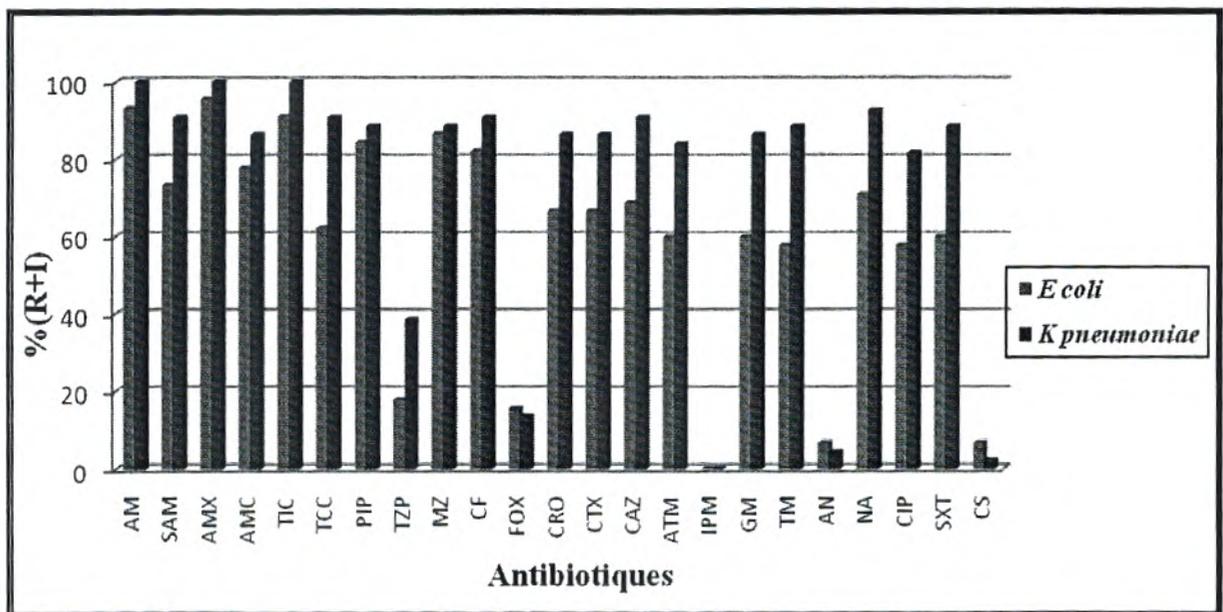


Figure 22. Pourcentages de résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*

Il ressort des résultats de la figure 22, que la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques (à l'exception de céfoxitine, amikacine et colistine) est nettement plus importante que celle d'*Escherichia coli*.

### **1.3.3 Résistance d'*Enterobacter cloacae***

Pour les 14 *Enterobacter cloacae* identifiés, 9 souches ont présenté une résistance vis-à-vis de 8 antibiotiques (pipéracilline, mezlocilline, ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime et aztréonam), alors que 6 étaient résistantes à la pipéracilline associée au tazobactam, gentamicine, tobramycine et triméthoprime/sulfaméthoxazole et 5 souches étaient résistantes aux quinolones.

### **1.4 Phénotypes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines**

Chaque mécanisme de résistance donne un profil d'antibiogramme (phénotype) bien spécifique. En effet, en utilisant des antibiotiques d'une même famille comme marqueurs de détection phénotypique, on peut suspecter le ou les mécanismes de résistance produits par une bactérie (Vedel, 1998).

L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des entérobactéries isolées du CHU de Tlemcen (figure 23), montre une nette dominance des souches productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (67%), avec 38 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 29 souches d'*Escherichia coli* et 5 souches d'*Enterobacter cloacae*. Parmi les entérobactéries présentant ce phénotype, 12 souches (10.7%), dont 6 *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Escherichia coli* et 2 *Enterobacter cloacae*, produisent également une céphalosporinase constitutive.

L'hyperproduction de céphalosporinases comme seul mécanisme de résistance est observée chez seulement 6 souches (5.4%). La production de pénicillinases est exclusivement observée chez 12 souches (10.7%) du genre *Escherichia* (11 *Escherichia coli* et 1 *Escherichia fergusonii*). Enfin, un total de 19 souches, soit 17% d'entérobactéries, dont 4 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 5 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes* et 1 *Serratia spp*, n'ont présenté aucune résistance acquise, donc considérées comme « sauvages ».

Pour la majorité des souches présentant le phénotype BLSE (figure 25), des synergies sont observées entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération et l'aztréonam. Par contre, chez quelques souches de ce phénotype, les images de synergie peuvent être masquées par une hyperproduction de céphalosporinase. Ainsi, un antibiogramme en présence de cloxacilline est réalisé afin de vérifier une éventuelle association du phénotype BLSE avec la production de céphalosporinase (figure 26).

Il est à noter que pour les souches productrices de BLSE, le tazobactam a permis de récupérer l'activité de la piperacilline dans 70% des cas.

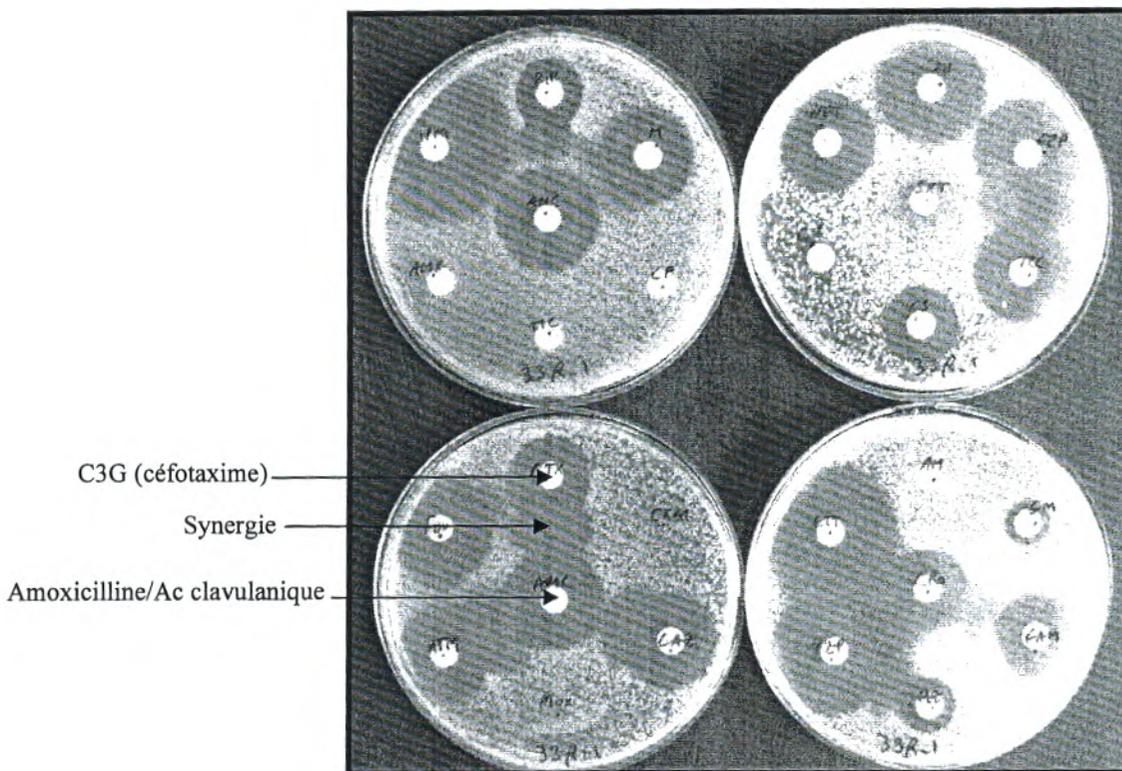
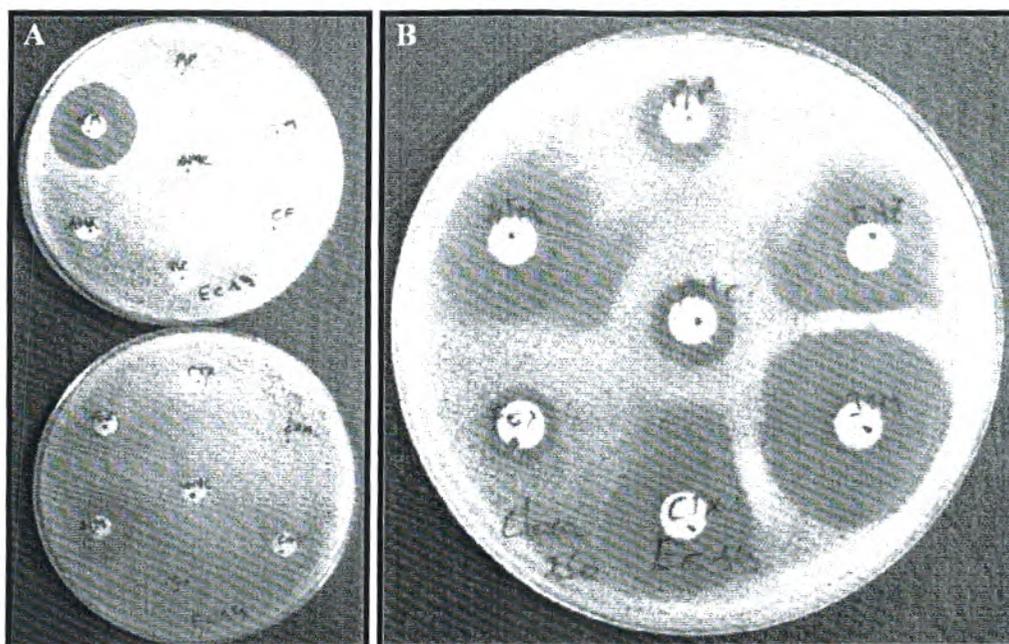


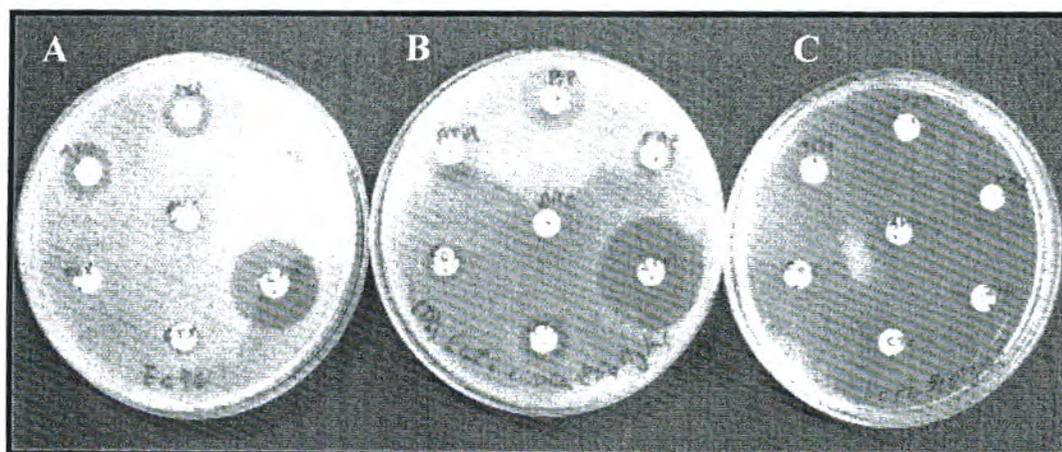
Figure 25. Phénotype BLSE



**Figure 26. Phénotype BLSE + CASE**

**A** : antibiogramme sans cloxacilline, **B** : antibiogramme avec cloxacilline à 250 µg/ml.

L'hyperproduction de céphalosporinase est également observée comme seul mécanisme de résistance, ce phénotype est confirmé par la restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération en présence de cloxacilline à une concentration définie (figure 27).



**Figure 27. Phénotype CASE haut niveau**

**A** : antibiogramme sans cloxacilline, **B** : antibiogramme avec cloxacilline à 250 µg/ml, **C** : antibiogramme avec cloxacilline à 500 µg/ml.

Tableau 3. Répartition des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines en fonction des services

Phénotypes	Nombre de souches isolées (%)	
	Réanimation	Autres services
BLSE	49 (64.5)	14 (38.9)
BLSE+CASE	5 (6.6)	7 (19.4)
CASE	1 (1.3)	5 (13.9)
PASE	10 (13.1)	2 (5.6)
Sauvage	11 (14.5)	8 (22.2)
Total	76 (100)	36 (100)

### 1.5 Résistances associées des entérobactéries

Les résistances associées aux aminosides (gentamicine et tobramycine), aux quinolones, et au triméthoprim/ sulfaméthoxazole sont plus fréquentes chez les souches produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, seules ou en association avec des céphalosporinases (tableau 4). Cette étroite association entre la production de BLSE et la résistance aux autres antibiotiques, peut s'expliquer par la diffusion de matériels génétiques (plasmides, transposons) codant pour ces caractères de résistance ou par la coexistence de plusieurs mécanismes de résistance (Philippon et Arlet, 2006 ; Gangoue Pieboji, 2007).

Des taux de résistance très faibles sont obtenus vis-à-vis de l'amikacine et de colistine pour les souches productrices de BLSE, alors qu'aucune résistance à ces antibiotiques n'est trouvée chez les souches produisant uniquement des céphalosporinases ou pénicillinases.

**Tableau 4. Résistances associées des entérobactéries en fonction des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

Phénotype	Nombre(%)	Nombre de souches résistantes (%)						
		GM	TM	AN	NA	CIP	SXT	CS
BLSE	63 (56.2)	58 (92.1)	58 (92.1)	6 (9.5)	57 (90.5)	52 (82.5)	55 (87.3)	2 (3.2)
BLSE+CASE	12 (10.7)	12 (100)	12 (100)	1 (8.3)	10 (83.3)	10 (83.3)	9 (75)	1 (8.3)
CASE	6 (5.4)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33.3)	0 (0)
PASE	12 (10.7)	2 (16.7)	2 (16.7)	0 (0)	4 (33.3)	2 (16.7)	6 (50)	0 (0)
Sauvage	19 (17)	1 (5.3)	1 (5.3)	0 (0)	6 (31.6)	3 (15.8)	3 (15.8)	3 (15.8)

### 1.6 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

L'analyse des résultats de CMI pour neuf antibiotiques effectuée en milieu solide a concerné 73 souches, dont 60 BLSE, 10 BLSE + CASE et 3 CASE. Les intervalles des CMI observés pour chaque phénotype sont consignés dans le tableau 5. Les résultats détaillés pour toutes les souches sont présentés en annexe 9.

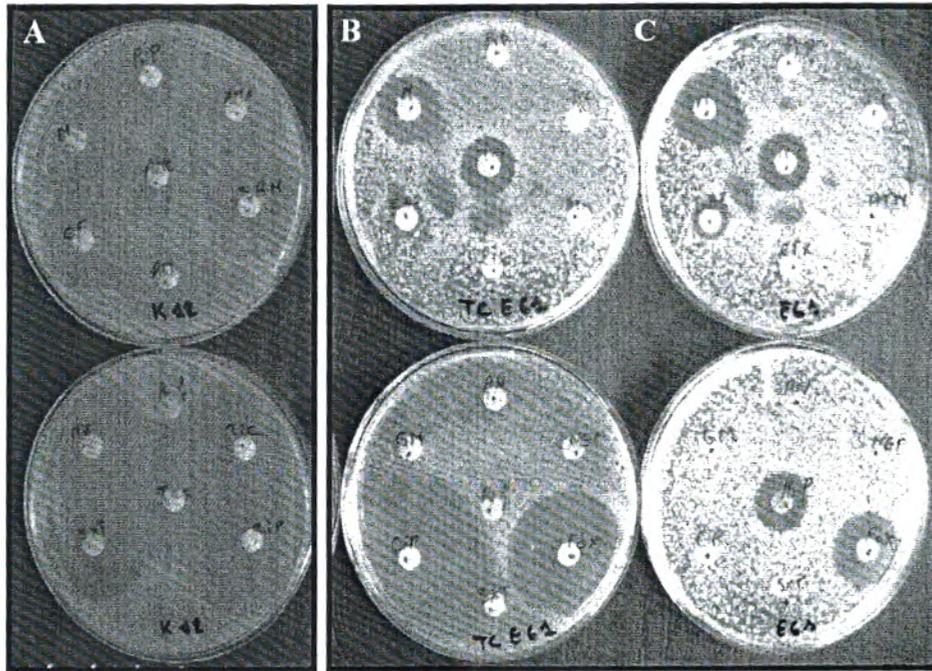
**Tableau 5. Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés en fonction des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

Phénotype	PIP	TZP	CTX	CAZ	GM	TM	RIF	CIP	IPM
	$\leq 8$ $>64$	$\leq 8$ $>64$	$\leq 1$ $>2$	$\leq 1$ $>8$	$\leq 2$ $>4$	$\leq 2$ $>4$	$\leq 4$ $>16$	$\leq 0.125$ $>1$	$\leq 2$ $>8$
BLSE	256->512	1-32	16->512	0.5-256	0.25->512	0.5->512	8->512	$\leq 0.125$ ->128	0.125-1
BLSE+CASE	256->512	16-64	64->512	16-256	16->512	4->512	16->512	$\leq 0.125$ ->32	0.125-1
CASE	128->512	8-256	32-256	16->512	1-8	0.5-2	16-64	$\leq 0.125$ -0.25	0.125-1

Tableau 6 : Résultats de conjugaison

Souches	Phénotype de résistance	Résistance associée	Transfert	Phénotype Tc	Résistances cotransférées
E 61	BLSE+ CASE	AN, GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	AN, GM, TM, SXT
E 62	BLSE	AN, GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	AN, GM, TM, SXT
E 64	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM
E 68	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
E 69	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM
E 71	BLSE	GM, TM, SXT	(-)	/	/
E 73	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
E 79	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
E 83	CASE	SXT	(-)	/	/
E 87	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM
E 88	BLSE	GM, TM	(+)	BLSE	GM, TM
E 89	BLSE	AN, GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM
E 90	BLSE	NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	RIEN
E 94	BLSE	GM, TM, NA, CIP	(-)	/	/
E 99	BLSE+ CASE	GM, TM	(+)	BLSE	GM
E 104	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT
E 105	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, CS	(-)	/	/
kp 61	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 62	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 63	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM
Kp 66	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 67	BLSE	AN, GM, TM, NA, SXT	(+)	BLSE	AN, GM, TM, SXT, NA
Kp 74	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
Kp 79	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 80	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE+ CASE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Kp 81	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 95	BLSE+ CASE	GM, TM	(+)	BLSE	GM, TM
kp 96	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM, SXT, NA, CIP
kp 98	BLSE	GM, TM, SXT	(-)	/	/
kp 99	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
kp 101	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Ec 15	CASE	GM, TM, SXT	(-)	/	/
Ec 17	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(-)	/	/
Ec 18	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE+ CASE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Ec 19	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE+ CASE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Ec 20	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Ec 21	BLSE	GM, TM, NA, CIP, SXT	(+)	BLSE	GM, TM, SXT, NA, CIP
Ec 26	CASE	aucune	(-)	/	/
Ec 27	CASE	RIEN	(-)	/	/
Ec 28	CASE	RIEN	(-)	/	/
CK 1	BLSE	AN, GM, TM, SXT	(+)	BLSE	AN, GM, TM, SXT
CK 2	BLSE	GM, TM	(+)	BLSE	GM, TM
C 4	BLSE	AN, GM, TM, SXT	(+)	BLSE	AN, GM, TM, SXT

Tc : Transconjugant ; E : *Escherichia coli* ; kp : *Klebsiella pneumoniae* ; Ec : *Enterobacter cloacae* ; Ck : *Citrobacter koseri* ; C : *Citrobacter freundii*.



**Figure 29. AntibioGramme de la souche réceptrice K12 Rif R (A), la souche donatrice E61 (C) et son transconjugant (B)**

Parmi les souches qui présentent le phénotype BLSE + CASE, la nature plasmidique de céphalosporinases n'est détectée que pour trois souches : kp 80, Ec 18, et Ec 19 (figure 30). Ce phénotype résulte de l'acquisition d'un gène AmpC plasmidique. Mobilisé par transposition, ce gène migre du chromosome des espèces naturellement productrices de céphalosporinases vers des plasmides souvent conjugatifs qui peuvent ensuite diffuser au sein des entérobactéries (Nadjar et al., 2000).

L'absence de transfert de phénotype céphalosporinase chez les souches E61, E83, E99, E 104, E 105, Ec 15, Ec 26, Ec 27 et Ec 28 est probablement en rapport avec la nature chromosomique du gène AmpC chez ces espèces (Bonnet, 2006).

## 2. Discussion

Les bacilles à Gram négatif occupent une place importante parmi les germes responsables d'infections nosocomiales (Paterson, 2006). La fréquence de leur résistance acquise aux antibiotiques, notamment aux  $\beta$ -lactamines, justifie la nécessité des études sur la distribution des différentes espèces et leur sensibilité aux antibiotiques. Ainsi, entre octobre 2008 et juin 2009, 234 bacilles à Gram négatif ont été isolés à partir de divers services du CHU de Tlemcen. La fréquence d'isolement obtenue pour les entérobactéries était de 43.6%, alors que celle observée pour les BGN non fermentants étudiés parallèlement (Mesli, 2010) était de 47.5%. Comparativement, les résultats rapportés par une étude française révèlent plutôt un isolement plus fréquent des entérobactéries avec un taux de 81% (Trystram et al., 2002). De plus, il est important de noter que 68% des entérobactéries et 74.6% de BGN non fermentants étudiés ont été isolés seulement à partir du service de réanimation. Ces taux sont largement supérieurs à ceux obtenus par Trystram et al. (2002) (14% des entérobactéries et 35.9% de BGN non fermentants). Ces fréquences importantes d'isolement de BGN en réanimation, suggèrent une transmission manuportée et un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier. En outre, ces espèces sont des bactéries nosocomiales par excellence dans les unités de soins intensifs. Leur capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance, la multiplication des manœuvres invasives sur des terrains fragilisés (ventilation assistée, sondage urinaire) et la pression de sélection des antibiotiques sont ainsi des éléments favorisant (Elouennass et al., 2008).

Pour les entérobactéries étudiées, les résultats révèlent qu'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* étaient les espèces les plus isolées, ce qui concorde bien avec ceux obtenus en Tunisie (Messai et al., 2007), au Maroc (Sekhsokh et al., 2008) et en France (Gardien et al., 1997). Il est nécessaire de préciser que les taux d'isolement observés pour ces deux espèces sont pratiquement identiques avec 40.2% et 39.3% respectivement, contrairement aux études citées ci-dessus où on note une dominance d'*Escherichia coli* suivie de *Klebsiella pneumoniae* en deuxième place. Ces différences sont apparemment liées aux types de prélèvements pratiqués et à l'écologie bactérienne des centres hospitaliers (Scheftel et al., 1994). Ainsi, la répartition des espèces isolées était différente selon les sites de prélèvement. L'isolement fréquent d'*Escherichia coli* à partir des prélèvements rectaux peut être expliqué par le caractère commensal de cette bactérie au niveau du tube digestif (Ahoyo et al., 2007). Cette espèce est fréquemment impliquée dans des bactériémies à point de départ digestif (Van der Waaij, 1992; Hughes et al., 1997). Elle est également l'agent principal des infections

Cette étude, effectuée sur une collection de 112 souches d'entérobactéries isolées au CHU de Tlemcen entre octobre 2008 et juin 2009, souligne la place importante occupée par certaines espèces comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et montre que la résistance des entérobactéries aux antibiotiques est devenue inquiétante à l'hôpital de Tlemcen. En effet, pour les différentes espèces d'entérobactéries étudiées, les  $\beta$ -lactamines perdent leur place essentielle dans l'arsenal thérapeutique, en particulier les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les uréidopénicillines, les céphalosporines et les associations  $\beta$ -lactamines-inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, à l'exception du tazobactam qui permet de récupérer l'activité de pipéracilline dans 71.4 % des cas. Cette résistance aux  $\beta$ -lactamines est associée à plusieurs mécanismes, dont la production de pénicillinases (10.7%), la production de céphalosporinases AmpC (16.1%), mais le plus important étant la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (67%). Ainsi, la présence des gènes codant les BLSE sur des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination chez les différentes espèces isolées. En plus, leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement aux aminosides et aux quinolones, concourt à une co-sélection de la résistance aux  $\beta$ -lactamines par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutique humaine. Par ailleurs, ces souches productrices de BLSE ont présenté une sensibilité totale à l'imipénème et des faibles taux de résistance vis-à-vis de l'amikacine et de la colistine. Cela augmente le choix des associations d'antibiotiques, associations indispensables pour le traitement des infections nosocomiales sévères (**David et al., 2008**).

Enfin, la prise en charge du problème des entérobactéries productrices de BLSE est un véritable défi, du fait de la diversité et de l'ubiquité des gènes codant ces enzymes et de l'endémicité progressive de ces souches parmi les patients admis en soins intensifs, hôpitaux et la population générale (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). Les microbiologistes sont confrontés à l'émergence continue de nouvelles enzymes et à l'association de différentes enzymes et mécanismes de résistance dans le même organisme. Ainsi, des analyses moléculaires sont nécessaires et paraissent indispensables pour une compréhension et une réaction plus adaptées à l'émergence de ces bactéries multirésistantes, d'autant plus qu'elles permettent de rattacher les événements locaux à ceux observés à l'échelle mondiale. La constitution d'un comité au sein de l'hôpital chargé d'un programme pour le contrôle de la circulation des bactéries multirésistantes, s'avère ainsi une priorité pour nos hôpitaux. En effet, il semble pertinent de mettre en place des équipes de gestion des antibiotiques et des spécialistes en maladies infectieuses qui travailleraient conjointement avec le laboratoire et l'hygiène hospitalière afin d'aborder le problème dans une optique pluridisciplinaire.

# Références bibliographiques

1. **Adjidé C.C, Biendo M, Rousseau F, Hamdad-Daoudi F, Thomas D, Laurans G, Canarelli B, Obin O, Hénicque M, Schmit J.L. (2006).** *Escherichia coli* producteurs de bêtalactamases à spectre étendu: de nouvelles menaces nosocomiales? Pathologie. Biologie. 54: 510–517.
2. **Ahoyo A.T, Baba-Moussa L, Anago A.E, Avogbe P, Missihoun T.D, Loko F, Prévost G, Sanni A, Dramane K. (2007).** Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. Médecine et maladies infectieuses 37 : 746–752.
3. **Alhambra A, Cuadros J.A, Cacho J, Gomez-Garces J.L, Alos J.I. (2004).** In vitro susceptibility of recent antibiotic-resistant urinary pathogens to ertapenem and 12 other antibiotics. J. Antimicrob Chemother. 53: 1090–4.
4. **Amazian K, Fendri C, Missoum M.F.K, Bouzouaia N, Rahal K, Savey A, et al. (2006).** Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis. 25: 340–3.
5. **Ambler R.P. (1980).** The structure of b-lactamases. Philos Trans R. Soc. London. Ser B. 289: 321–331.
6. **Arlet G, Philippon A. (2003).** Les nouvelles B-lactamases à l'aube du troisième millénaire. Revue française des laboratoires, N° 352.
7. **Avril J.L, Denis F, Dabernat H, Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. Ellipses : 3<sup>ème</sup> édition; Paris. P : 149-184.
8. **Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2002).** Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum b-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 151–9.
9. **Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton M.P, Kuli B, Lugagne-Delpon N, Mourlan C, Jaffar-Bandjee M.C. (2010).** Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêtalactamases à spectre élargi. Pathologie Biologie. 58: 18–24.
10. **Ben Achour N, Chouchani C, Bouhawela N, Amor A, Belhadj O. (2007).** Identification d'une ceftazidimase plasmidique produite par une souche clinique de *Proteus mirabilis*. Pathologie Biologie. Article in press.
11. **Ben Redjeb S, Ben hassen A, Hammami A, Kechrid A. (2000).** Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie. « Résistance aux antibiotiques ». Press.Méd. 1-5.



71. **Jarlier V, Nordmann P. (2000).** Entérobactéries et b-lactamines. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Paris: Éditions ESKA-Alexandre Lacassagne. P. 649–665.
72. **Jiang X, Ni Y, Jiang Y. (2005).** Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol.* 43: 826–31.
73. **Joly B, Reynaud A. (2003).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Tec et Doc ; Paris. P : 3-89.
74. **Jones R.N, Baquero F, Privitera G, Inoue M, Wiedermann B. (1997).** Inducible b-lactamase-mediated resistance to third generation cephalosporins. *Clin. Microbiol. Infect.* 3(1): 7S–20S.
75. **Kado C.I, Liu S.T. (1981).** Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriology.* 145(3) : 1365-1373.
76. **Kazmierczak A. (1999).** Inhibiteurs des B-lactamases. In : Bryskier. A. Antibiotiques Agents antibactériens et antifongiques. Paris : Ellipses. P : 446-457.
77. **Kolar M, Urbanek K, Latal T. (2001).** Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J. Antimicrob. Agents.* 17: 357-63.
78. **Lambert T. (1997).** Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. *Réan. Urg.* 6 : 9s-16s.
79. **Lambert T. (2006).** Aminosides et bactéries à GRAM négatif. In. Courvalin P, Leclerck R, Bingen E. Antibiogramme. Paris. ESKA : 2<sup>ème</sup> édition. Chapitre 19. P : 227-246.
80. **Larabi K, Masmoudi A, Fendri C. (2003).** Étude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un centre hospitalo-universitaire de Tunis: à propos de 1930 cas. *Médecine et maladies infectieuses.* 33:348–52.
81. **Lavigne J.P, Sotto A, Merle C, Jourdan J, Soussy C.J, Sirot D. (2002).** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux B-lactamines et prévalence en clinique. *Pathol. Biol.* 50 : 388-93.
82. **Lavigne J.P. (2007).** Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
83. **Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, et al. (2006).** Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (7): 2433–8.

84. **Lee K, Lim Y. S, Yong D, Yum J.H, Chong Y. (2003).** Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-B-lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* And *Acinetobacter spp.* J. Clin. Microbiol. 41 (10) : 4623-4629.
85. **Lewin C, Howard B, Smith J.T. (1991).** Protein- and RNA- synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. J. Med. Microbiol. 34 : 19-22.
86. **Liassine N. (2000).** Problèmes des pathogènes Gram négatifs résistant aux antibiotiques en milieu hospitalier. Schweiz. Med. Wochenschr. 130: 1930-6.
87. **Livermore D, Williams J.D. (1996).** B-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams and Wilkins. P. 502–578.
88. **Livermore D.M, Woodford N. (2006).** The b-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. TRENDS in Microbiology. 14 (9).
89. **Livermore D.M. (1995).** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8:557-584.
90. **Livermore D.M. (2001).** Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapénèmes. J. Antimicrob. Chemother. 47 (3): 247-50.
91. **Loli A, Tzouvelekis L.S, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos A.C, Tassios P.T, et al. (2006).** Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. J. Antimicrob. Chemother. 58: 669–72.
92. **Magnet S, Blanchard J.S. (2005).** Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. Chem. Rev. 105: 477-497.
93. **Mainardi J.L, Mugnier P, Coutrot A, Buu-Hoi A, Collatz E, Gutmann L. (1997).** Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. Antimicrob. Agents chemother. 41 : 2352-2354.
94. **Marchall B.J, Boudon N.J, Richard D. (1991).** Les milieux de culture pour isolement et identification biochimique des bactéries. Ed. Doin.
95. **Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G.A. (1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 351: 797–9.

96. **Massova I, Mobashery S. (1998).** Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(1): 1-17.
97. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. (2000).** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCDOprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3322–3327.
98. **Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frère J.M. (1998).** Catalytic properties of class A B-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.*, 330: 581-598.
99. **Matar G.M, Cuzon G, Araj G.F, Naas T, Corkill J, Kattar M.M, et al. (2008).** Oxacillinase mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 887–8.
100. **Maurin M, Musso D, Charrel R, Perez R, N'Guyen A, Dumon H, De Micco. (1995).** Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacilles à Gram négatif aérobies) situation 1992 à Marseille. *Med. Mal. Infect*;25:508–14.
101. **Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Perrier Gros Claude J.D, Timinouni M. (2009).** Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie.* Article in press.
102. **Mesli A. (2010).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* au CHU de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.
103. **Messai L, Achour W, Ben Hassen A. (2007).** Profil épidémiologique des entérobactéries isolées chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie.* 55 :230–234.
104. **Messai Y, Benhassine T, Naim M, Paul G, Bakour R. (2006).** Prevalence of B-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Esq Quimioterap.* 19 (2): 144-151.
105. **Messai Y, Iabaden H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie.* 56: 319–325.
106. **Mirabaud M.I. (2003).** Entérobactéries à Béta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. Phd. Département de pédiatrie, Faculté de médecine, l'Université de Genève.
107. **Mirò E, Mirelis B, Navarro F, Matas L, Giménez M, Rabaza C. (2005).** *Escherichia coli* Producing an ACC-1 Class C  $\beta$ -Lactamase Isolated in Barcelona, Spain. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* P. 866–867.

133. **Rodriguez-Villalobos H, Struelens M.J. (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*. 15 : 205–213.
134. **Roh K.H, Uh Y, Kim J.S, Kim H.S, Shin D.H, Song W. (2008).** First outbreak of multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* producing both SHV-12-type extended-spectrum beta-lactamase and DHA-1-Type AmpC beta-lactamase at a Korean Hospital Yonsei. *Med J*. 49(1): 53–7.
135. **Rossolini G.M, D'Andrea M.M, Mugnaioli C. (2008).** The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 14 (Suppl. 1): 33–41.
136. **Roy D. (2000).** Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à GRAM négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux B-lactamines chez un isolat de *Salmonella* spp. Isolé au QUÉBEC. Thèse de doctorat Département de biochimie et de microbiologie. Faculté des sciences et de génie. Université Laval.
137. **Ruppé E. (2010).** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*. 12: 3-16.
138. **Sambrook J, Russel D.W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual. Ed. CSHL. Press. Vol 1. Chapter 1, protocol 26 ; chapter 5, protocole 1.
139. **Scheftel J.M, Weber M et le Groupe Français « USI ». (1994).** Résistance à 16 antibiotiques de 3876 bacilles à Gram négatif aérobies isolés dans 39 centres de soins intensifs en France (1991). *Méd Mal Infect*. 24: 255-62.
140. **Sekhsokh Y, Chadli M, El Hamzaoui S.A. (2008).** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et maladies infectieuses*. 38: 324–327.
141. **Seoane A, Francia M.V, Garcia Lobo J.M. (1992).** Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 36: 1049-1052.
142. **Seoane A, Garcia Lobo J.M. (1991).** Nucleotide sequence of a new class A B-lactamase gene from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*: implications for the evolution of class A B-lactamases. *Mol. Gen. Genet*. 228: 215-220.
143. **Sirot J. (1996).** Detection of extend-spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. *Clin. Microbiol. Infect*. 2(1): 35–9.

144. **Soussy C.J. (2000).** Antibiotiques, généralités. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Boillet C. Précis de bactériologie clinique. Paris: ESKA- Alexandre Lacassagne. P : 557–569.
145. **Soussy C.J. (2006).** Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In. Courvalin P, Leclerc R, Bingen E. AntibioGramme. Paris. ESKA : 2<sup>ème</sup> édition. Chapitre 21. P : 261-277.
146. **Sutton G.H.C. (2004).** Enumeration of total airborne bacteria, yeast and mold contaminants and identification of *Escherichia coli* O157 : H7, *Listeria Spp.*, *Salmonella Spp.*, and *Staphylococcus Spp.* in a beef and pork slaughter facility. Phd. University of Florida.
147. **Tagajdid M.R, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. (2010).** Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. Médecine et maladies infectieuses. 40: 70-73.
148. **Tankovik J, (2000).** Mécanismes d'action des antibiotiques. Précis de bactériologie clinique. Edition ESKA. P : 584-595.
149. **Tenover F.C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control. 34(5):S3–S10.
150. **Tietz A, Francioli P, Widmer A.F, et al. (2004).** Bêtalactamases à spectre étendu : implications pour l'hygiène hospitalière. Swiss noso. 11, Numéro 4, article 2.
151. **Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Ang- Kucuker M, Ang O. (2004).** Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Clin Microbiol Infect. 10: 72–5.
152. **Tortora G.J, Funke B.R, Case C.L. (2003).** Introduction a la microbiologie. Ed : Renouveau Pédagogique.
153. **Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Christofe de champs. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 B-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria. International Journal of Antimicrobial Agents. 27 : 397–402.
154. **Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De Champs C. (2008).** First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 60: 287–290.

**Annexe 3. Concentrations et diamètres critiques des antibiotiques utilisés  
(CA-SFM, 2008)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)		
			S	R	S	R	
<b>Bêta-lactamines</b>	Ampicilline	AM	10µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
	Ampicilline + Sulbactam	SAM	10/10 µg	≤ 4/8	> 16/8	≥ 19	< 14
	Amoxicilline	AMX	25µg	≤ 4	> 16	≥ 21	< 14
	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	(20/10µg)	≤ 4/2	> 16/2	≥ 21	< 14
	Ticarcilline	TIC	75µg	≤ 16	> 64	≥ 22	< 18
	Ticarcilline + acide clavulanique	TCC	(75/10µg)	≤ 16/2	> 64/2	≥ 22	< 18
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤ 8	> 64	≥ 20	< 12
	Pipéracilline + tazobactam	TZP	(75/10µg)	≤ 8/4	> 64/4	≥ 21	< 14
	Mezlocilline	MZ	75µg	≤ 8	> 32	≥ 21	< 16
	Céfalotine	CF	30µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
	Céfoxitine	FOX	30µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
	Céfotaxime	CTX	30µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
	Céftazidime	CAZ	30µg	≤ 1	> 8	≥ 26	< 19
	Ceftriaxone	CRO	30µ	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
	Imipénème	IPM	10µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Aztréonam	ATM	30µg	≤ 1	> 8	≥ 27	< 21	
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AN	30µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
	Gentamicine	GM	15µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
	Tobramycine	TM	10µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
<b>Rifamycines</b>	Rifampicine	RIF	30µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
<b>Polypeptides</b>	Colistine	CS	50µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
<b>Sulfamides - Triméthoprime</b>	Sulfaméthoxazol - Triméthoprime	SXT	(1,25/23,75 µg)	≤ 2/38	> 8/152	≥ 16	< 10

## Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin et al., 2006)

Solution initiale (µg/ml)	Solution mère (ml)	Eau distillée stérile (ml)	Concentration obtenue (µg/ml)	Concentration finale dans le milieu (µg/ml)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0.5	3.5	640	64
5120	0.5	7.5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0.5	3.5	40	4
320	0.5	7.5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0.5
20	0.5	3.5	2.5	0.25

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

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

Annexe 9. Tableau des valeurs de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )9 a. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype BLSE

Souches	PIP	TZP	CTX	CAZ	GM	TM	RIF	CIP	IPM	Phénotype
E 62	>512	16	256	64	>512	>512	16	$\geq 64$	0,125	BLSE
E 64	512	2	64	16	32	8	16	16	0,25	BLSE
E 68	512	2	64	8	32	8	32	8	0,25	BLSE
E 69	512	4	64	16	32	8	32	8	0,25	BLSE
E 71	>512	2	64	8	16	8	16	$\leq 0,125$	0,25	BLSE
E 73	>512	8	64	8	32	32	32	>32	0,125	BLSE
E 74	>512	4	64	8	32	16	32	8	0,125	BLSE
E 75	>512	2	64	8	16	8	16	16	0,25	BLSE
E 77	512	2	64	4	32	8	16	16	0,125	BLSE
E 78	512	2	64	4	32	16	16	16	0,125	BLSE
E 79	512	16	64	8	32	32	32	>32	0,125	BLSE
E 80	512	1	64	2	32	2	16	0,25	0,125	BLSE
E 84	512	2	16	0,5	32	2	16	0,25	0,25	BLSE
E 85	512	2	64	0,5	0,5	0,5	$\geq 64$	0,25	0,25	BLSE
E 87	> 512	8	>512	128	32	4	16	8	0,25	BLSE
E 88	> 512	2	> 512	8	32	4	32	$\leq 0,125$	0,25	BLSE
E 89	> 512	4	> 512	32	> 512	> 512	32	32	0,25	BLSE
E 90	512	4	128	2	0,5	0,5	32	16	0,25	BLSE
E 93	> 512	32	256	64	64	64	/	> 128	0,25	BLSE
E 94	> 512	32	256	256	64	32	256	> 128	0,5	BLSE
E 96	> 512	32	256	64	64	64	/	> 128	0,25	BLSE
E 101	> 512	16	256	64	32	32	/	> 128	0,25	BLSE
kp 61	> 512	16	256	16	32	16	16	32	0,125	BLSE
kp 62	512	16	128	16	32	32	64	32	0,125	BLSE
kp 64	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,125	BLSE
kp 65	> 512	16	256	64	32	32	16	>16	0,125	BLSE
kp 66	> 512	16	256	32	32	32	32	8	0,125	BLSE
kp 67	> 512	4	512	16	>512	>64	32	0,125	0,125	BLSE
kp 68	> 512	16	256	64	32	32	16	>16	0,125	BLSE
kp 69	> 512	16	256	32	32	32	32	8	0,5	BLSE
kp 70	> 512	16	256	16	32	16	16	32	0,25	BLSE
kp 73	> 512	16	256	64	32	32	16	>16	0,25	BLSE
kp 74	> 512	16	256	32	32	32	32	8	0,25	BLSE
kp 76	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 77	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 78	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 81	> 512	16	256	32	32	32	32	8	0,25	BLSE
kp 82	> 512	16	256	32	32	32	32	8	0,25	BLSE
kp 83	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 84	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 85	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 86	512	8	128	16	128	32	32	16	0,25	BLSE
kp 87	512	8	128	16	128	32	32	16	0,25	BLSE
kp 88	512	8	128	16	0,25	8	32	16	0,25	BLSE
kp 89	512	8	128	16	128	32	32	16	0,25	BLSE
kp 90	512	8	128	16	128	32	32	16	0,25	BLSE
kp 91	> 512	16	256	16	32	32	16	64	0,25	BLSE
kp 92	> 512	32	256	32	64	64	>256	32	0,25	BLSE
kp 93	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE
kp 94	$\geq 512$	16	256	16	64	64	8	16	0,25	BLSE
kp 98	> 512	32	128	4	32	8	64	$\leq 0,125$	0,5	BLSE
kp 99	512	32	> 512	128	32	32	32	32	1	BLSE
kp101	> 512	16	> 512	128	64	32	32	32	1	BLSE
kp 102	> 512	32	> 512	256	256	64	> 512	128	1	BLSE
Ec 17	256	8	64	4	32	32	64	4	0,25	BLSE
Ec 20	512	16	64	16	32	16	64	4	0,5	BLSE
Ec 21	>512	16	32	8	32	16	32	1	0,5	BLSE
Ck 1	>512	4	256	64	>512	/	/	0,25	0,125	BLSE
Ck 2	>512	16	256	32	>64	>64	64	0,5	0,125	BLSE
C 4	512	4	256	8	>64	>64	32	0,125	1	BLSE

9 b. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype BLSE+ CASE

Souches	PIP	TZP	CTX	CAZ	GM	TM	RIF	CIP	IPM	Phénotype
E 61	>512	32	512	128	>512	>512	32	>32	0,125	BLSE+CASE
E 99	> 512	32	> 512	256	16	8	> 512	$\leq 0,125$	0,5	BLSE+CASE
kp 63	> 512	16	256	32	32	32	32	>32	0,125	BLSE+CASE
kp 79	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE+CASE
kp 80	> 512	16	256	32	32	32	16	16	0,25	BLSE+CASE
kp 95	> 512	16	> 512	64	32	4	64	0,25	0,5	BLSE+CASE
kp 96	> 512	32	> 512	128	512	64	32	32	1	BLSE+CASE
kp 97	> 512	16	> 512	128	32	4	32	8	1	BLSE+CASE
Ec 18	512	64	128	16	128	128	64	4	0,125	BLSE+CASE
Ec 19	256	16	64	16	32	32	64	4	0,5	BLSE+CASE

9 c. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype CASE

Souches	PIP	TZP	CTX	CAZ	GM	TM	RIF	CIP	IPM	Phénotype
E 83	128	8	32	128	1	0,5	16	0,25	0,125	CASE
Ec 15	>512	16	32	16	8	2	64	0,125	1	CASE
Ec 26	256	256	256	$\geq 512$	0,25	0,5	64	$\leq 0,125$	1	CASE

## Annexe 11. Résultats des antibiogrammes

11 a. Profils d'antibiorésistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines

Souches	IPM	PIP	TZP	AMX	AMC	TIC	TCC	AM	SAM	MZ	CF	FOX	CTX	CAZ	CRO	ATM	phénotype de résistance
E 61	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+CASE
E 62	S	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 63	S	I	S	R	I	R	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	PASE
E 64	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
E 66	S	I	S	R	S	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	PASE
E 67	S	I	S	R	I	R	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	PASE
E 68	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 69	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 70	S	S	S	R	S	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	PASE
E 71	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 72	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	PASE
E 73	S	I	S	R	R	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
E 74	S	I	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
E 75	S	I	S	R	I	R	S	R	S	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
E 76	S	I	S	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	S	S	S	PASE
E 77	S	R	S	R	I	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	R	BLSE
E 78	S	R	S	R	I	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	R	BLSE
E 79	S	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	I	R	R	BLSE
E 80	S	I	S	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	R	S	BLSE
E 81	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
E 82	S	I	S	R	I	R	S	R	I	I	I	S	S	I	S	S	PASE
E 83	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CASE
E 84	S	I	S	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	I	R	S	BLSE
E 85	S	I	S	R	R	R	I	R	I	R	R	S	R	S	R	S	BLSE
E 86	S	S	S	R	I	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	PASE
E 87	S	R	S	R	I	R	I	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 88	S	R	S	R	I	R	I	R	S	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
E 89	S	R	S	R	I	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 90	S	R	S	R	I	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
E 91	S	I	S	R	R	R	S	R	S	I	R	S	S	S	S	S	PASE
E 92	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	PASE
E 93	S	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E 94	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	BLSE
E 95	S	I	S	R	R	R	S	R	I	R	I	S	S	S	S	S	PASE
E 96	S	I	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	BLSE
E 97	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	Souche sauvage
E 98	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	Souche sauvage
E 99	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	BLSE+ CASE

Souches	IPM	PIP	TZP	AMX	AMC	TIC	TCC	AM	SAM	MZ	CF	FOX	CTX	CAZ	CRO	ATM	phénotype de résistance
E 100	S	I	S	R	S	R	S	R	S	I	R	S	R	I	R	R	BLSE
E 101	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E102	S	R	I	R	I	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E103	S	R	I	R	I	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	R	BLSE
E104	S	R	I	R	I	R	I	R	I	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+ CASE
E105	S	R	I	R	I	R	I	R	I	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+ CASE
kp 61	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 62	S	R	S	R	I	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 63	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+CASE
kp 64	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 65	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 66	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 67	S	R	S	R	S	R	I	R	I	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 68	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 69	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 70	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 71	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
kp 72	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
kp 73	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 74	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 75	S	I	S	R	S	R	I	R	I	I	S	S	S	I	S	S	Souche sauvage
kp 76	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 77	S	I	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 78	S	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 79	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+CASE
kp 80	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+CASE
kp 81	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 82	S	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 83	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 84	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 85	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 86	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 87	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 88	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 89	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 90	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 91	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 92	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 93	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 94	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 95	S	R	S	R	R	R	I	R	I	R	R	I	R	I	R	I	BLSE+ CASE
kp 96	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+ CASE
kp 97	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+ CASE

kp 98	S	R	S	R	I	R	I	R	I	R	R	s	I	I	I	S	BLSE
kp 99	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	s	R	R	R	R	BLSE
kp 100	S	S	S	R	I	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	Souche sauvage
kp 101	S	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 102	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
kp 103	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
kp 104	S	S	S	R	S	R	I	R	S	S	I	S	S	I	S	S	Souche sauvage
Ec 15	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	CASE
Ec 16	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S	Souche sauvage
Ec 17	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
Ec 18	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE+CASE
Ec 19	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	BLSE+CASE
Ec 20	S	R	S	R	I	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE
Ec 21	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	BLSE
Ec 22	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	Souche sauvage
Ec 23	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	Souche sauvage
Ec 24	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S	R	R	S	S	S	S	Souche sauvage
Ec 25	S	S	S	R	I	S	S	I	I	S	R	R	S	S	S	S	Souche sauvage
Ec 26	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CASE
Ec 27	S	I	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	CASE
Ec 28	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CASE
K ox09	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
C k1	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	BLSE
E fergusonii	S	S	S	R	S	R	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	PASE
E.aerogenes	S	S	S	R	I	S	S	R	S	S	I	R	S	S	S	S	Souche sauvage
C frendii	S	R	S	R	I	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	BLSE
C k2	S	R	S	R	I	R	S	R	S	R	R	S	R	I	R	I	BLSE
K ox10	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
Serratia	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	Souche sauvage
Pantoeae	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CASE

souche	Service	Origine	AN	GM	TM	CIP	NA	CS	SXT
kp 99	Réanimation	pv trachéal	S	R	R	R	R	S	R
kp 100	Réanimation	pv réctal	S	S	S	S	S	S	I
kp 101	Réanimation	pv réctal	S	R	R	R	R	S	R
kp 102	Chir B	Matlas	I	R	R	R	R	S	R
kp 103	Chir A	plaie	S	S	S	S	I	S	S
kp 104	Traumato	plaie	S	S	S	I	I	R	S
Ec 15	Réanimation	pv réctal	S	R	R	S	/	S	R
Ec 16	Réanimation	pv réctal	S	S	S	S	/	S	S
Ec 17	Réanimation	Sonde vésicale	S	R	R	R	R	S	R
Ec 18	Neurochir	plaie (dos)	S	R	R	R	R	S	R
Ec 19	Réanimation	respirateur	S	R	R	R	R	S	R
Ec 20	Neurochir	plaie (dos)	S	R	R	R	R	S	R
Ec 21	Réanimation	pv réctal	S	R	R	I	R	S	R
Ec 22	Traumato	plaie (pied)	S	S	S	S	S	S	S
Ec 23	Réanimation	pv trachéal	S	S	S	S	S	R	S
Ec 24	Chir A	lame	S	S	S	S	S	S	S
Ec 25	Traumato	plaie	S	S	S	S	S	S	S
Ec 26	Chir A	plaie	S	S	S	S	S	S	S
Ec 27	Chir A	plaie	S	S	S	S	S	S	S
Ec 28	Chir A	plaie	S	S	S	S	S	S	S
K ox09	Neurochir	plaie	S	S	S	S	/	S	S
C k1	Réanimation	pv trachéal	R	R	R	S	R	S	R
E fergusonii	Réanimation	pv réctal	S	S	S	S	/	S	R
E.aerogenes	Réanimation	pv trachéal	S	S	S	S	/	S	S
C frendii	Chir A	plaie	R	R	R	S	S	S	R
C k2	Réanimation	pv réctal	S	R	I	S	I	S	S
K ox10	Réanimation	pv trachéal	S	S	S	S	S	S	S
Serratia	Neurochir	plaie	S	S	S	S	S	R	S
Pantoeae	Chir A	plaie	S	S	S	S	/	S	S