

MAST-570-18 / 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 Biologiques



Mémoire de Master en Biologie

Option : Contrôle du Développement microbien

THEME

Etude de la résistance aux antibiotiques *d'Acinetobacter baumannii* au niveau des services de traumatologie et de médecine interne du CHU de Tlemcen

Présenté par

M<sup>elle</sup> TALEB Chafika



Devant le jury:

M<sup>r</sup> RAHMOUN N

M<sup>r</sup> SENOUCI BREKSI M

M<sup>r</sup> DRISSI M

Président

Examineur

Promoteur

Année Universitaire : 2012-2013

## Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon bon DIEU de m'avoir accordé la santé, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Je remercie vivement Monsieur DRISSI M, maitre de conférences à l'université de Tlemcen d'avoir bien voulu accepter d'être mon directeur de ce mémoire, qui est à l'origine de ce travail. Tout d'abord merci pour sa rigueur, ses conseils, son enseignement, son soutien matériel.

Merci également A Monsieur RAHMOUN N maître assistant classe A à l'université Abou Bekr Belkaid qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de mémoire.

Merci aussi à Mr SENOUCI BREKSI M maître assistant classe A à l'université Abou Bekr Belkaid qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Un grand merci à tous les membres de mon équipe du laboratoire : Madame MESLI Esmâ, Madame SOUNA Djahida, Madame BENSABER Fatema Z, Melle AYED Amel, Melle SAFRAOUI Imane, Melle Nadia, Melle Siham et surtout Monsieur SALAH Moustafa pour leur soutien et leurs conseils judicieux.

Ainsi que tout le personnel du « laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologique » de l'université Abou BekrBelkaid où a été réalisé ce travail.

Profonds reconnaissances à mes amis et collègues pour leur aide et pour l'ambiance studieuse fraternelle et sympathique, grâce à qui, ces années resteront inoubliables : Téma, Wassila, Fatiha, saadia et Amine.

Je remercie tous qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Je terminerai en remerciant toute ma famille et plus particulièrement mes parents et mon cher oncle pour m'avoir soutenu, encouragé, conseillé. Je leur dédie ce mémoire.

# Sommaire

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Liste des figures.....      |           |
| Liste des tableaux.....     |           |
| Liste des abréviations..... |           |
| Liste des annexes.....      |           |
| Introduction .....          | <b>01</b> |

## Partie 1. Synthèse bibliographique

|   |           |
|---|-----------|
| 1. Acinetobacter baumannii .....  | <b>02</b> |
| 1.1. Classification et nomenclature .....                                   | <b>02</b> |
| 1.2. Caractères bactériologiques.....                                       | <b>02</b> |
| 1.3. Epidémiologie et habitat .....   | <b>03</b> |
| 2. Les antibiotiques .....  | <b>03</b> |
| 2.1. Les bêta-lactamines .....  | <b>04</b> |
| 2.1.1. Définition et classification .....                                   | <b>04</b> |
| 2.1.2. Mode d'action .....  | <b>06</b> |
| 2.1.3. Les bêta-lactamases .....  | <b>07</b> |
| 2.2. Les fluoroquinolones .....   | <b>08</b> |
| 2.3. Les aminosides .....   | <b>09</b> |
| 3. Le mécanisme de résistance d' <i>A.baumannii</i> aux antibiotiques ..... | <b>10</b> |
| 3.1. Résistance naturelle .....   | <b>10</b> |
| 3.2. Résistance acquise .....   | <b>11</b> |
| 3.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....                              | <b>11</b> |
| 3.2.1.1. Mécanisme enzymatique .....  | <b>11</b> |
| 3.2.1.2. Mécanisme non enzymatique .....                                    | <b>14</b> |
| 3.2.2. Résistance aux aminosides .....                                      | <b>15</b> |
| 3.2.3. Résistance aux fluoroquinolones .....                                | <b>16</b> |
| 3.2.4. Résistance aux autres antibiotiques .....                            | <b>16</b> |

## **Partie 2. Matériel et méthodes**

|   |    |
|---|----|
| 1. Matériel.....  | 18 |
| 1.1. Matériel biologique.....   | 18 |
| 1.2. Milieux de culture.....  | 18 |
| 1.3. Solutions.....   | 18 |
| 1.4. Antibiotiques.....   | 18 |
| 1.5. Test biochimique.....  | 19 |
| 2. Méthodologie.....  | 19 |
| 2.1. Prélèvements.....  | 19 |
| 2.10. Typage moléculaire par PCR.....                                 | 25 |
| 2.2. Isolement et purification.....                                   | 19 |
| 2.3. Identification.....  | 19 |
| 2.3.1. Test d'oxydase.....  | 19 |
| 2.3.2. Test TSI (milieu triple sucres).....                           | 20 |
| 2.3.3. Galerie API 20NE.....  | 20 |
| 2.4. Antibiogramme.....   | 21 |
| 2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI..... | 22 |
| 2.6. Test à la cloxacilline.....                                      | 22 |
| 2.7. Test de Hodge.....   | 23 |
| 2.8. Test à l'EDTA.....   | 24 |
| 2.9. E-test.....  | 24 |
| 2.10. Typage moléculaire par PCR.....                                 | 25 |

## **Partie 3. Résultats et discussion**

|  |    |
|--|----|
| 1. Résultats.....  | 27 |
| 1.1. Prélèvement.....  | 27 |
| 1.2. Identification d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....              | 29 |
| 1.3. Résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux antibiotiques..... | 29 |
| 1.3.1 Résultats d'antibiogramme.....                                     | 29 |
| 1.3.2. Détermination des niveaux de CMI.....                             | 32 |
| 1.4. Phénotypes de résistance.....                                       | 32 |
| 1.4.1. L'hyperproduction de céphalosporinases.....                       | 32 |
| 1.4.2. Production de carbapénèmase.....                                  | 33 |
| 1.5. Résultats de l'amplification par PCR.....                           | 34 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2. Discussion.....                      | 35        |
| <b>Conclusion.....</b>                  | <b>37</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b> | <b>38</b> |
| <b>Annexes.....</b>                     | <b>43</b> |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Structure des quatre principales classes de bêta-lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau bêta-lactame ..... | 6  |
| <b>Figure 2.</b> Mécanisme d'action des bêta-lactamines au niveau de la synthèse du peptidoglycane .....   | 7  |
| <b>Figure 3.</b> Voie catalytique générale des bêta-lactamases à sérine active .....   | 8  |
| <b>Figure 4.</b> Structure chimique de l'acide nalidixique, de la ciprofloxacine et de la moxifloxacine .....  | 9  |
| <b>Figure 5.</b> Représentation schématique des principaux mécanismes de résistance aux bêta-lactamines des bactéries Gram négatif .....                               | 15 |
| <b>Figure 6.</b> Lecture du test de Hodge .....  | 24 |
| <b>Figure 7.</b> Lecture d'E-test .....  | 25 |
| <b>Figure 8.</b> Plaque API 20 NE d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....  | 27 |
| <b>Figure 9.</b> Répartition des bacilles à Gram négatif par rapport aux prélèvements.....   | 28 |
| <b>Figure 10.</b> Fréquence d'isolement d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....  | 28 |
| <b>Figure 11.</b> Répartition d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées dans les deux services.....  | 29 |
| <b>Figure 12.</b> Répartition d' <i>Acinetobacter baumannii</i> en fonction des sites de prélèvement.....  | 29 |
| <b>Figure 13.</b> Taux de résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> au bêta-lactamines.....   | 30 |
| <b>Figure 14.</b> Pourcentage de résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux autres classes d'antibiotiques.....  | 30 |
| <b>Figure 15.</b> Pourcentage de résistance d' <i>Acinetobacter baumannii</i> aux bêta-lactamines au niveau de deux services.....                                      | 31 |
| <b>Figure 16.</b> Répartition des phénotypes de résistance des souches d' <i>A. baumannii</i> .....  | 31 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 17.</b> Résultats de l'E-test.....                               | 32 |
| <b>Figure 18.</b> Résultats du test à la cloxacilline.....                 | 32 |
| <b>Figure 19.</b> Résultat du test de Hodge.....                           | 33 |
| <b>Figure 20.</b> Résultats du test IPM-EDTA.....                          | 34 |
| <b>Figure 21.</b> Profil de migration après amplification du gène NDM..... | 34 |

## Liste des Tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1.</b> Les bêta-lactamases décrites chez <i>Acinetobacter baumannii</i> ..... | 13 |
| <b>Tableau 2.</b> Les différents prélèvements réalisés dans les deux services.....       | 27 |
| <b>Tableau 3.</b> Résultats des CMI des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....  | 32 |

## Liste des annexes

|  |    |
|--|----|
| <b>Annexe 1.</b> Tableau de lecture des résultats de la galerie 20NE.....  | 42 |
| <b>Annexe 2.</b> Tableau d'identification du catalogue analytique de la galerie 20NE.....  | 43 |
| <b>Annexe 3.</b> Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour<br><i>Acinetobacter spp</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> et <i>Burkholderia cepacia</i> ..... | 44 |
| <b>Annexe 4.</b> Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin et <i>al.</i> , 1991).....   | 45 |
| <b>Annexe 5.</b> Résultats de l'antibiogramme des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....  | 46 |
| <b>Annexe 6.</b> Résultats des CMI des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 47 |
| <b>Annexe 7.</b> Photos d'antibiogrammes des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....   | 48 |

## Liste des abréviations

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ARN** : acide ribonucléique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BET** : Bromure d'éthidium

**BGN** : bacille à Gram négatif

**BGNnF** : bacille à Gram négatif non fermentant

**BHIB** : brain heart infusion broth

**BLSE** : bêta-lactamase à spectre élargi

**BMR** : bactérie multirésistante

°C : degré Celsius

**C1G** : céphalosporinase 1<sup>ère</sup> génération

**C2G** : céphalosporinase 2<sup>ère</sup> génération

**C3G** : céphalosporinase 3<sup>ère</sup> génération

**C4G** : céphalosporinase 4<sup>ère</sup> génération

**CA-SFM** : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**CTX-M** : Céfotaximase-Munich

**D-ala** : D-alanine

**DNase** : désoxyribonucléase

**D.O** : Densité optique

**EDTA** : éthylène-diamine-tétra-acétique

**GES** : Guyana Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène

**ONPG** : Orthonitroohényl- $\beta$ -D-galactopyrannoside

**OXA** : Oxacillinase

**MβL** : métallo-bêta-lactamase

**MH** : Mueller Hinton

**NDM** : New Delhi metallo-β-lactamase

**OMP** : Outer membrane protein

**PCR** : polymerase chain reaction

**PLP** : protéines liant les pénicillines

**SHV** : SulfHydryl Variable

**spp** : espèce

**TBE** : Tris-EDTA

**TEM** : TEMoneira-nom du patient

**UFC** : unité formant cellule

**VEB** : Vietnam Extended-Spectrum β-lactamase

**VIM** : Verona integron-encoded metallo-β-lactamase

# INTRODUCTION

# Introduction

---

L'avènement de l'antibiothérapie, dans les années 1940, a complètement révolutionné le domaine médical et entraîne une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses. Malheureusement, en raison d'une exposition inutile aux antibiotiques, la résistance bactérienne à ces derniers a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. La résistance à la pénicilline s'est développée dans les années 1950, aux céphalosporines de première génération dans les années 1970 et aux céphalosporines de troisième génération dans les années 1990. On estime que 60 % des infections nosocomiales sur le plan mondial sont provoquées par des bactéries résistantes **(Carle, 2009)**.

Le genre *Acinetobacter* représente aujourd'hui un modèle d'adaptation particulièrement efficace en termes d'antibiorésistance. En l'espace de 40 ans, *Acinetobacter*, principalement représenté par l'espèce *baumannii*, est passé du statut de « bactérie sans grand intérêt en infectiologie » car peu pathogène et sensible à la plupart des antibiotiques commercialisés à une bactérie multirésistante aux antibiotiques. Sa capacité à disséminer dans l'environnement hospitalier et d'acquérir rapidement des mécanismes de résistance a conduit parfois à des impasses thérapeutiques **(Decré, 2012)**. *Acinetobacter baumannii* est l'un des germes les plus incriminés dans les infections nosocomiales sur la scène mondiale **(Naija et al, 2009)**.

Plusieurs études ont été faites sur ce germe, dont une réalisée dans les unités de soin intensifs au niveau du CHU de Tlemcen **(Drissi et al., 2010)**. Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer la fréquence d'isolement et de caractériser le profil de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux différents antibiotiques, isolés à partir du service de médecine interne et de traumatologie au niveau du CHU de Tlemcen.

SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

# Synthèse bibliographique

---

## 1. *Acinetobacter baumannii*

### 1.1. Classification et nomenclature

L'histoire du genre *Acinetobacter* débute au début du XXème siècle avec la description par un microbiologiste néerlandais Martinus Willem Beijerinck d'un microorganisme dénommé *Micrococcus calcoaceticus* isolé à partir de prélèvement de sol. C'est en 1954 que Brisou et Prévost proposent la désignation du genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* : « Incapable de bouger »). Une avancée majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en 1986 grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de Bouvet et Grimont qui sont parvenus à distinguer 12 espèces génomiques ou genomic species. A ce jour, 35 espèces bactériennes d'*Acinetobacter* ont été décrites, dont 26 espèces nommées et neuf espèces génomiques. **(Camp et al., 2010 ; Howard et al., 2012).**

Certaines étant clairement dénommées comme *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter lwoffii* et *Acinetobacter baumannii* qui représente l'espèce d'*Acinetobacter* de la plus grande importance clinique. Le genre *Acinetobacter* est actuellement défini comme appartenant à la famille des *Moraxellaceae* qui regroupe les genres *Moraxella*, *Acinetobacter* et *Psychrobacter* **(Bergogne-Bérézin et Towner, 1996).**

Certaines espèces sont très proches et difficiles à distinguer, notamment *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomic species 3, et *Acinetobacter* genomic species 13TU qui sont regroupées sous le terme du complexe *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Acb) **(Dijkshoorn et al., 2007).**

### 1.2. Caractères bactériologiques

*A. baumannii* se présente comme des coccobacilles à gram négatif souvent associés par deux, en diplocobacilles, immobiles, non pigmentée, pendant la croissance il prend une forme de tige, forment des colonies jaune pâle à blanc grisâtre sur milieu solide.

*A. baumannii* biochimiquement aérobie strict, non fermentante, Oxydase négative, Catalase positive, incapable de réduire le nitrate **(Giamarellou et al., 2008 ; Bergogne-Bérézin et Towner, 1996).**

## 1.3. Epidémiologie et habitat

*A. baumannii* est une bactérie omniprésente dans la nature (sols, eaux, animaux) et commensal chez l'homme en bonne santé de façon transitoire à une faible densité sur la peau chaude et humide de l'aisselle, l'aîne, la gorge entre les orteils, des narines et du tractus intestinal, mais sans causer généralement d'infection, *A. baumannii* ne se trouve que rarement dans le cadre de la microflore cutanée normale, selon une étude seulement 3% (ou plus) de la population sont colonisés par la bactérie (**Jaggi et al., 2012 ; Howard et al., 2012**). Cette bactérie a également été isolée de la tête et les poux du corps humaine (**Kempf et al., 2012**).

Depuis quelques années, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'infections nosocomiales sévères comme les pneumopathies, ou il est responsable de 7,8 à 23% de la mortalité par pneumonie acquise dans les hôpitaux et 10 à 43% en unités de soins intensifs (**Ramoul et al., 2013**). De plus, les bactériémies, les infections de l'appareil urinaire et les méningites secondaires, *A. baumannii* peut également provoquer des infections de la peau et des tissus mous, notamment au niveau des plaies chez les blessés de guerre, où un grand nombre de militaire rapatriés de la guerre en Iraq et en Afghanistan sont infectés d'*A. baumannii* (**Camp et al., 2010**).

Cette bactérie adhère facilement non seulement à des surfaces biologiques mais aussi abiotiques, sur laquelle il est capable de former des biofilms ce qui facilite le processus de colonisation du matériel prothétique (**Gordon et Wareham, 2010**), dont la manifestation la plus frappante d'*A.baumannii* est l'apparition endémique et épidémique des souches multirésistantes dans les hôpitaux (**Dijkshoorn et al., 2007**).

La gravité et l'évolution souvent fatale de ces infections sont dues à la conjonction d'un terrain immunodéprimé et à une bactérie ayant une capacité d'acquérir et d'accumuler les facteurs de résistance à de nombreux antibiotiques. (**Giamarellou et al., 2008**).

## 2. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes.

Quelques exemples sont cités :

- La Pénicilline est produite par un champignon "*penicillium notatum*".
- Le Chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique.

# Synthèse bibliographique

---

Les antibiotiques sont définis par leur :

- activité antibactérienne (spectre d'activité) ;
- toxicité sélective (mode d'action) ;
- activité en milieu organique (pharmacocinétique) ;
- bonne absorption et diffusion dans l'organisme (**Yala et al., 2001**).

## 2.1. Les bêta-lactamines

### 2.1.1. Définition et classification

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette large utilisation est due à leur spectre d'action, leur faible toxicité et à leur efficacité (**Cavallo et al., 2004**).

La base commune à toutes les bêta-lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame laquelle est indispensable pour l'activité des molécules. À partir de cette structure, quatre groupes ont été développés par adjonction d'un cycle : les pénames, les céphèmes, les pénèmes ou par substitution, les monobactames. Les inhibiteurs des bêta-lactamases appartiennent également à cette famille (**Bryskier, 1999**).

#### ❖ Les pénicillines

Les pénicillines représentent les antibiotiques les plus actifs, les moins toxiques et les plus utilisés en clinique, Leur structure chimique de base est le noyau commun : l'acide 6-amino-pénicillanique (un noyau  $\beta$ -lactame liée à un cycle thiazolidine) (**Neuman, 1979**).

Elles sont regroupés au sein de la classe des pénames, ce groupe est constitué d'un nombre important de molécules, selon leur structure chimique, entre autre: Pénicilline G, Pénicilline M, Les pénicillines  $\alpha$ -carboxypénicillines, Amidinopénicillines (**Bryskier, 1999**).

#### ❖ Les céphalosporines

Les céphalosporines (céphèmes) se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine « noyau céphème », On distingue quatre générations de céphalosporines. Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés. En voici quelques exemples :

- Première génération : céfadroxil, céfalaridine, céfalotine, céfapirine, céfazoline, céfradine, céfalexine ;
- Deuxième génération : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine, céfotiam, céfoxitine, céfaclor, céfatrizine, céforanide, céfotétan ;

## Synthèse bibliographique

---

- Troisième génération : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone ;
- Quatrième génération : céfépime, cefpirome (**Corvaglia, 2006**).

### ❖ .Les carbapénèmes

Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénams) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3, ont un très large spectre antibactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases. (**Wolff et al., 2009**).

Quatre molécules sont actuellement commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème. Le spectre d'action *in vitro* contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et anaérobies est pratiquement identique pour les quatre molécules. La différence la plus notable concerne l'ertapénème, dont l'activité sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* est trop limitée pour une utilisation clinique (**Grall et al., 2011**).

### ❖ Les monobactames

Les monobactames sont des bêta-lactamines monocycliques relativement peu actifs. Leur activité est plus marquée vis-à-vis des germes à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif. L'activité anti Gram-négatif (entérobactéries) de l'aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle des céphalosporines (**Adam, 1992**).

### ❖ Les inhibiteurs de bêta-lactamases

Les inhibiteurs des bêta-lactamases sont soit des pénicillines, comme le tazobactam ou le sulbactam, soit des clavames (dérivés des pénames par substitution du soufre en position 1 par un oxygène), comme l'acide clavulanique, possèdent une activité antibiotique généralement faible. Ce sont des substrats qui se lient de manière irréversible aux bêta-lactamases de la classe A de Ambler en se fixant sur leurs sites actifs empêchant l'action de celle-ci sur les bêta-lactamines. Ce type de bêta-lactamines ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec une autre bêta-lactamine comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline ce qui permet de récupérer, au moins partiellement, leur activité en présence de souches bactériennes productrices de bêta-lactamases (**Cavallo et al., 2004**).

# Synthèse bibliographique

## 1.2 Mode d'action des bêta-lactamines

Les bactéries possèdent au niveau de leur paroi un polymère majeur, le peptidoglycane ou muréine, qui représente une structure vitale pour la bactérie. De ce fait, la synthèse du peptidoglycane, apparaît comme une cible privilégiée des antibiotiques. Les bêta-lactamines interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane par inhibition de certaines enzymes PLP (Protéines liant les pénicillines) responsables de la transpeptidation, Elles présentent une analogie structurale entre le noyau bêta-lactame et le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. Leur reconnaissance par les transpeptidases et les carboxypeptidases (PLP) aboutit à la fixation du cycle bêta-lactame sur le site actif de ces enzymes cibles. Cette fixation irréversible entraîne une ouverture du cycle bêta-lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne (Cavallo et al., 2004).

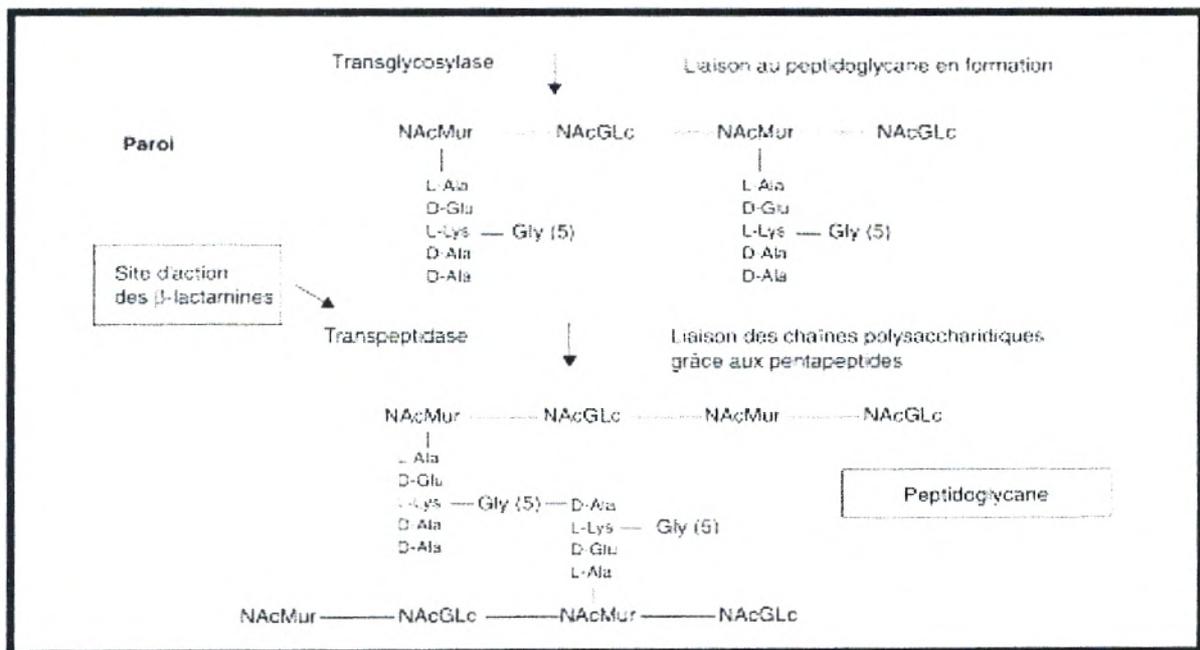
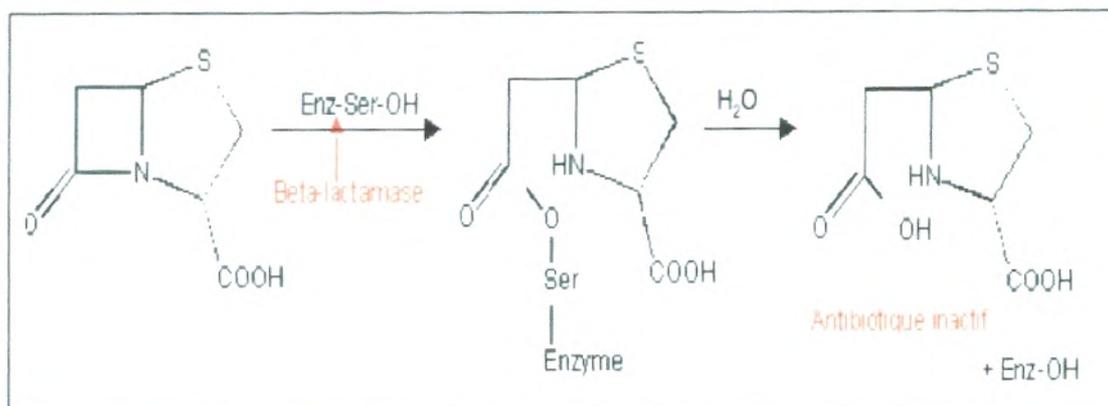


Figure 2. Mécanisme d'action des bêta-lactamines au niveau de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al., 2004).



**Figure 3. Voie catalytique générale des bêta-lactamases à sérine active (Barrial et Scotet, 2006)**

Selon La classification d'Ambler, il existe quatre catégories de bêta-lactamases selon leur spectre enzymatique (Boyer *et al.*, 2011).

- **Les bêta-lactamases de classe A :** pénicillinases de type sérine protéases, inhibés par l'acide clavulanique et la tazobactam, comme les principales CTX-M BLSE, les nouvelles carbapénèmes KPC.

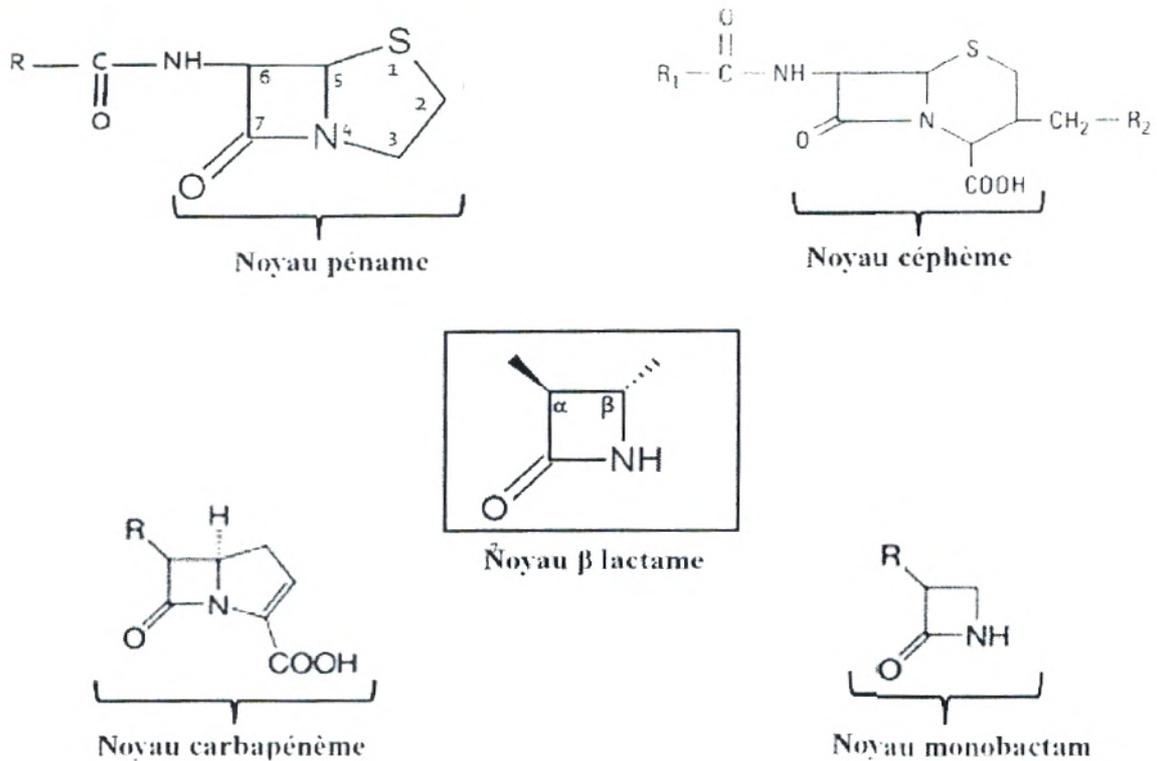
- **Les bêta-lactamases de classe B :** métallo-enzymes, comme certaines carbapénèmes, dont le site actif contient au moins un ion zinc (et pas une sérine), leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif.

- **Les bêta-lactamases de classe C** ou céphalosporinases insensibles à l'acide clavulanique mais inhibés par la cloxacilline, comme les céphalosporinases de type AmpC.

- **Les bêta-lactamases de classe D :** oxacillinases hydrolysant la cloxacilline et peu inhibées par l'acide clavulanique, constituant une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse.

### 2.2. Les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones figurent parmi les antibactériens les plus prescrits aujourd'hui dans le monde. Le recours fréquent à ces antibactériens s'explique par leurs avantages pharmacodynamique (spectre d'activité) et pharmacocinétique. Ces antibiotiques sont des composés de synthèse dont le développement de cette classe peut être décrit en termes de générations, chaque génération partageant des caractéristiques ou spectres antimicrobiens similaires. L'acide nalidixique, dérivée des antipaludéens, est la première représentante des quinolones et a été utilisée pour la première fois en 1962. Depuis, des modifications structurelles ont entraîné des fluoroquinolones par l'addition d'un fluor en C6 du cycle



**Figure 1. Structure des quatre principales classes de bêta-lactamines obtenues par substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau bêta-lactame (Figueiredo, 2011)**

## 2.1.2. Mode d'action des bêta-lactamines

Les bactéries possèdent au niveau de leur paroi un polymère majeur, le peptidoglycane ou muréine, qui représente une structure vitale pour la bactérie. De ce fait, la synthèse du peptidoglycane, apparait comme une cible privilégiée des antibiotiques. Les bêta-lactamines interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane par inhibition de certaines enzymes PLP (Protéines liant les pénicillines) responsables de la transpeptidation, Elles présentent une analogie structurale entre le noyau bêta-lactame et le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. Leur reconnaissance par les transpeptidases et les carboxypeptidases (PLP) aboutit à la fixation du cycle bêta-lactame sur le site actif de ces enzymes cibles. Cette fixation irréversible entraîne une ouverture du cycle bêta-lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne (Cavallo et al., 2004).

## Synthèse bibliographique

---

Selon La classification d'Ambler, il existe quatre catégories de  $\beta$ -lactamases selon leur spectre enzymatique (Boyer *et al.*, 2011).

▪ **Les bêta-lactamases de classe A** : pénicillinases de type sérine protéases, inhibés par l'acide clavulanique et la tazobactam, comme les principales CTX-M BLSE, les nouvelles carbapénèmases KPC.

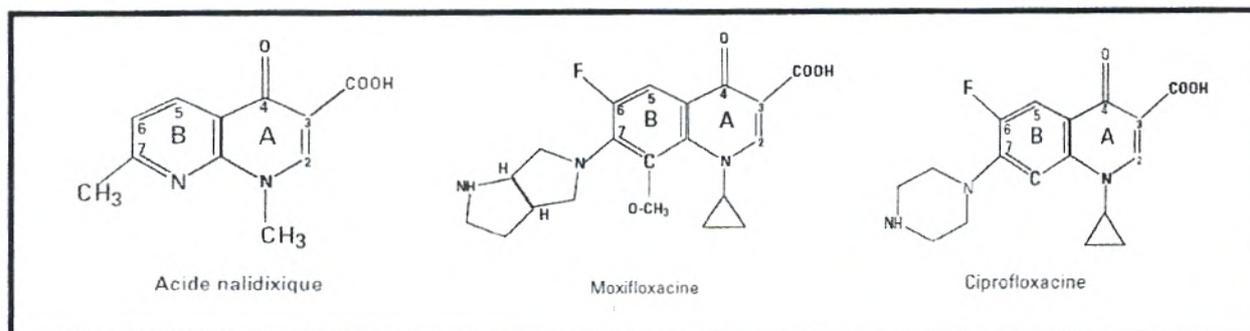
▪ **Les bêta-lactamases de classe B** : métallo-enzymes, comme certaines carbapénèmases, dont le site actif contient au moins un ion zinc (et pas une sérine), leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif.

▪ **Les bêta-lactamases de classe C** ou céphalosporinases insensibles à l'acide clavulanique mais inhibés par la cloxacilline, comme les céphalosporinases de type AmpC.

▪ **Les bêta-lactamases de classe D** : oxacillinases hydrolysant la cloxacilline et peu inhibées par l'acide clavulanique, constituant une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse

### 2- les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones figurent parmi les antibactériens les plus prescrits aujourd'hui dans le monde. Le recours fréquent à ces antibactériens s'explique par leurs avantages pharmacodynamique (spectre d'activité) et pharmacocinétique. Ces antibiotiques sont des composés de synthèse dont le développement de cette classe peut être décrit en termes de générations, chaque génération partageant des caractéristiques ou spectres antimicrobiens similaires. L'acide nalidixique, dérivée des antipaludéens, est la première représentante des quinolones et a été utilisée pour la première fois en 1962. Depuis, des modifications structurelles ont entraîné des fluoroquinolones par l'addition d'un fluor en C6 du cycle pyridine et d'un cycle pipérazyl en C7, de deuxième, de troisième et de quatrième génération entre autre la ciprofloxacine, la lévofloxacine, la moxifloxacine (Bolon, 2011 ; Cambau et Guillard, 2012).



**Figure 4. Structure chimique de l'acide nalidixique, de la ciprofloxacine et de la moxifloxacine (Cambau et Guillard, 2012).**

Le mécanisme d'action de cette classe pharmacologique consiste en une inhibition de l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV bactériennes, des enzymes impliqués dans la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN bactérien (**Bolon, 2011**). Les quinolones se fixent sur le complexe enzyme-ADN, Ce complexe devient irréversible, conduisant d'une part à l'immobilisation des enzymes qui entraînent la bactériostase et d'autre part à la libération des cassures double-brin de l'ADN, responsable de la bactéricidie intense des quinolones (**Cambau et Guillard, 2012**).

### 3 les aminosides

Les aminosides (ou aminoglycosides) sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et héli-synthétiques. Elles sont classées par Umezawa en 1979 puis par Bryskier en 1995 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes : Streptomine, 2 désoxystreptomine et Streptidine (**Yala et al., 2001**).

Les aminosides agissent en inhibant la synthèse protéique des bactéries par fixation sur le ribosome S30. Ce sont des antibiotiques dotés d'une bactéricidie rapide à large spectre. Ces antibiotiques possèdent une forte activité antibactérienne contre un grand nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif à l'exception des bactéries anaérobies (**Gauzit, 2011**).

## Synthèse bibliographique

---

### III Les mécanismes de résistance d'*A. baumannii* aux antibiotiques

L'émergence des souches d'*A. baumannii* multirésistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques a été attribuée à leur capacité rapide d'accumuler des mécanismes de résistance tout en étant bien adaptés pour les échanges génétiques. Par conséquent, *Acinetobacter* appartient à une classe unique de bactéries à Gram-négatif, qui se caractérisent comme « naturellement transformable » (Perez et al., 2007). La résistance touche de nombreuses classes d'antibiotiques : les bêta-lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones (Johannes et al., 2001). À ce jour, certaines souches d'*A. baumannii* sont presque devenues résistantes à tous les antibiotiques actuellement disponibles (Ramoul et al., 2013).

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique, les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle où Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie, soit acquise suite à des modifications génétiques par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (Carle, 2009).

#### 1 Résistance naturelle

*A. baumannii* possède dans son génome un gène codant pour la production d'une bêta-lactamase de type céphalosporinase (AmpC). Cette céphalosporinase est à l'origine de la résistance naturelle de cette espèce aux aminopénicillines, à la céfalotine et à la céfoxitine (mais pas au sulbactam), contrairement aux AmpC produites naturellement par plusieurs entérobactéries, l'expression de cette enzyme chez *A. baumannii* n'est pas inductible en raison de l'absence d'un gène régulateur en amont du gène *blaampC* (Poirel et Nordmann, 2006). Plusieurs types de céphalosporinases ont été caractérisés chez *A. baumannii*. Elles sont maintenant appelées ADC (*Acinetobacter*-derived-cephalosporinase). *A. baumannii* possède aussi naturellement sur son chromosome un gène codant pour une oxacillinase (ou  $\beta$ -lactamase de classe D) dont le représentant principal est OXA-51, avec des variants décrits comme OXA-69, OXA-66 par exemple (Decré, 2012).

*A. baumannii* dispose d'un nombre de porines inférieur à celles retrouvées chez *E. coli* et, de ce fait, présente une imperméabilité naturelle, cette imperméabilité est associée à une pompe à efflux appartenant au système RND, Ade/IJK, naturellement active vis-à-vis d'un large spectre d'antibiotiques incluant notamment le chloramphénicol et le triméthoprime mais

## Synthèse bibliographique

---

excluant les aminoglycosides. *A. baumannii* est également naturellement résistante à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprim, à l'acide pipémidique, à la norfloxacine (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et, est peu sensible à l'aztréonam. (Decré, 2012).

### 2 Résistance acquise

Ce type de mécanisme a souvent la faculté d'être transférable d'une bactérie à une autre (pouvant appartenir à des espèces ou des genres très différents, transmission horizontale), entraînant une diffusion importante de la résistance dans le monde bactérien, voire des épidémies. L'un des mécanismes qui favorise le plus la multirésistance chez *A. baumannii* est la capture et l'expression des gènes de résistance sous forme de cassettes au sein des intégrons. Cette structure génétique d'intégron favorise la co-sélection et la co-expression des gènes de résistance. Ainsi, au sein d'un intégron peuvent être associés des gènes différents de  $\beta$ -lactamases, des gènes de résistance aux aminosides, à la rifampicine et au chloramphénicol (Figueiredo, 2011).

#### 2.1 Résistance aux bêta-lactamines

##### 2.1.1 Mécanisme enzymatique

###### ❖ Pénicillinases

La description de résistances acquises aux pénicillines a été rapportée dès le début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinase TEM-1, puis du variant TEM-2. C'est ensuite la pénicillinase CARB-5 ont été caractérisées chez *A. baumannii* (Poirel et Nordmann, 2006). Et SCO-1, ces enzymes confèrent la résistance aux pénicillines à large spectre (ticarcilline, Pipéracilline) et sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Une oxacillinase a spectre étroit (OXA-21), portée par un intégron et conférant un phénotype de pénicillinase, a été décrite en 1997 (Decré, 2012).

###### ❖ Hyperproduction de céphalosporinase

La résistance aux céphalosporines à spectre étendu est intrinsèquement liée à la présence d'un élément en amont du codon d'initiation du gène *bla<sub>ampC</sub>* est connu sous le nom *ISAba1*, ce qui détermine la régulation du gène en entraînant une surexpression de céphalosporinase AmpC.

## Synthèse bibliographique

---

IS *Abal* apporte des séquences reconnues comme promotrices qui permettent donc d'élever très significativement le niveau de production de l'enzyme ce qui se répercute sur le phénotype de résistance par une élévation importante des CMI<sup>és</sup> des bêta-lactamines appartenant au spectre de substrat de cette enzyme. Céfépime et carbapénèmes semblent être stables vis-à-vis ces enzymes. (Howard *et al.*, 2012 ; Poirel et Nordmann, 2006).

### ❖ Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) de classe A du schéma du Ambler ont également été décrites chez *A. baumannii*, les plus classiques sont l'enzyme VEB-1 qui a été à l'origine d'une épidémie importante en France; PER-1 qui a été identifiée dans 55% de souches résistantes à la ceftazidime d' *A. baumannii* isolées en Turquie, le gène *bla*<sub>PER-1</sub> était localisé au sein d'une structure génétique de type transposon composite (Tn1213) composé de manière originale de deux IS très différentes encadrant le gène de  $\beta$ -lactamase et à l'origine de son acquisition ; PER-2 de l'Argentine. Par la suite, d'autres BLSE comme TEM-92 et TEM-116, CTX-M- 2 et CTX-M-43, et SHV-12 de la chine (Peleg *et al.*, 2008 ; Cattoir, 2008 ; Poirel et Nordmann, 2006). Et SHV-5, puis plus récemment CTX-M-15 ont été retrouvées ponctuellement ou ont été responsables de bouffées épidémiques (Decré, 2012).

### ❖ Bêta-lactamases conférant la résistance aux carbapénèmes

Chez *A. baumannii* la production de carbapénémases est le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu (Ramoul *et al.*, 2013). Ces enzymes conférant la résistance acquise aux carbapénèmes ont été caractérisées dans les quatre classes moléculaires de bêta-lactamases. Parmi la classe A de Ambler différentes enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes ont pu être identifiées chez *A. baumannii* : GES-11 ou GES-14. Ou encore des enzymes de type KPC (pour « *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase ») qui comprennent plusieurs variants (KPC-2, -3,-4,-10). Ces dernières sont beaucoup plus rares chez *Acinetobacter* (Decré, 2012).

Les métallobêta-lactamases (MBL) de la classe B possèdent la particularité de conférer la résistance aux carbapénèmes, les gènes codant pour ces enzymes sont portés par des intégrons Ces enzymes se sont diversifiées au sein de l'espèce *A. baumannii*, le groupe principalement représenté est le groupe IMP. (Perez *et al.*, 2007). Les groupes VIM et SIM de M $\beta$ L ont été identifiées aussi chez *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2008).

## Synthèse bibliographique

---

Aussi une autre M $\beta$ L intercontinental de type NDM pour New Delhi métallo-bêta-lactamase a été décrite chez *A. baumannii*, y compris une souche produit de NDM-1 a été identifiée en Algérie. (Boyer et al., 2011 ; Boulanger et al., 2012). Récemment, NDM-2 (variant de NDM-1) a été caractérisée dans une souche d'*A. baumannii* isolée en Allemagne (Decré, 2012).

C'est parmi la classe D des oxacillinases que l'on trouve le nombre le plus important d'enzymes impliquées dans la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* (Howard et al., 2012). La première carbapénémase de type oxacillinase a été décrite dans une souche d'*A. baumannii* était OXA-23 initialement nommé ARI-1 (*Acinetobacter* résistante à l'imipénème) codé par un gène plasmidique, a été observée en 1985 'en Ecosse (Ramoul et al., 2013). D'autres grands sous-groupes de ce type d'enzyme ont été identifiés chez *A. baumannii*, étant OXA-40, OXA-58 et OXA-143, Le gène bla<sub>OXA-58</sub> a été identifié dans le monde entier y compris l'Algérie où ce gène plasmidique pourrait contribuer à une propagation rapide de la résistance aux carbapénèmes chez *Acinetobacter* (Drissi et al., 2010).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 1. Les bêta-lactamases décrites chez *Acinetobacter baumannii* (Decré, 2012)**

| Classification de Ambler                        | Type d'enzyme   | Spectre d'activité   |
|---|---|--|
| CLASSE A<br>(sérine bêta- lactamase)            | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪TEM-1,-2 ; CARB-5 ; SCO-1</li> <li>▪CTX-M-2,-15 ; TEM-92 ; VEB-1 ; PER-1 ; SHV-12</li> <li>▪GES-11,-14</li> <li>▪KPC-2,-3,-4,-10</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪Pénicillines, C1G</li> <li>▪Toutes bêta-lactamines sauf céphamycines et carbapénèmes</li> <li>▪Carbapénèmes et C3G</li> <li>▪Toutes les bêta-lactamines</li> </ul>       |
| CLASSE B<br>(métallo-bêta-lactamase)            | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪IMP-1,-2,-4,-5,-6,-11 ; VIM-2,-4 ; SIM-1 ; NDM-2</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪toutes les bêta-lactamines sauf aztreonam</li> </ul>   |
| CLASSE C<br>(sérine bêta-lactamase)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>AmpC</li> <li>+ ISAb1</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪pas d'expression, non inductible</li> <li>▪expression amplifiée de niveau variable ampicilline, C1G, C2G (bas niveau) ; C3G, piper+ticarcilline (haut niveau)</li> </ul> |
| CLASSE D<br>(sérine bêta-lactamase)<br>Groupe I | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪OXA-21</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ampicilline-ticarcilline-Pipéracilline</li> <li>▪toutes bêta-lactamines carbapénèmes incluses.</li> <li>▪pas d'activité apparente (sauf si ISAb1).</li> </ul>            |
| Groupe II                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪OXA-23,-27,-49</li> </ul>   |  |
| Groupe III                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪OXA-51,-66,-69</li> </ul>   |  |
| Groupe IV                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪OXA-24,-25,-26,-37,-40,-72</li> </ul>   |  |
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪OXA-58</li> <li>▪OXA-143</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪toutes bêta-lactamines carbapénèmes incluses.</li> <li>▪pénicilline+ carbapénèmes</li> </ul>   |

## 2.1.2 Mécanisme non enzymatique

- **modification des PLPs**

Sept PLP ont à ce jour été identifiées dans l'espèce *baumannii* : PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3, PLP5/6, PLP6b, et PLP7/8. La PLP6b a été mise en cause dans une souche présentant une résistance aux carbapénèmes (Decré, 2012).

- **Diminution de la perméabilité**

Les Porines sont des protéines spécialisées de la membrane externe (OMP) qui permettent le passage des petits métabolites tels que le sucre, les acides aminés et les ions. Mais aussi les antibiotiques. *A. baumannii* possède un petit nombre de porines, ce qui la rend beaucoup moins perméable que les autres bactéries Gram négatif et qui pourrait être une raison pour la résistance intrinsèque attribuable à *A. baumannii* (Camp et al., 2010). Ainsi, le rôle de la perte ou de la modification de ces porines dans la résistance aux bêta-lactamines en particulier les carbapénèmes est fortement probable semble liée à l'inactivation d'un gène codant pour une porine nommée CarO, et la perte de la protéine 33-36 KDa, la protéine de 29 KDa (CarO), et une protéine de 43 KDa homologue à l'OPRD de *Pseudomonas aeruginosa* impliquée dans la résistance à l'imipénème (Gordon et Wareham, 2010 ; Grall et al., 2011).

- **Excrétion de l'antibiotique : efflux**

La réduction d'activité des antibiotiques peut également reposer sur la capacité des bactéries à les sécréter grâce à leurs pompes à efflux (Decré, 2012). Les systèmes d'efflux sont basés sur une pompe insérée dans la membrane interne de la bactérie et capable d'excréter l'antibiotique hors de celle-ci grâce à un canal présent dans la membrane externe et à une protéine de jonction périplasmique. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique et confère généralement des résistances de bas niveau. (Figueiredo, 2011).

Parmi les systèmes d'efflux décrits chez *A. baumannii*: AdeABC et AdeIJK, appartenant à la famille RND (Résistance-Nodulation-Division) conférant une résistance à un large spectre d'agents antimicrobiens y, compris les bêta-lactamines, La pompe AdeABC est retrouvée chez 80 % des souches d'*A. baumannii*.

## Synthèse bibliographique

La surexpression d'AdeABC est responsable d'une résistance de haut niveau aux carbapénèmes notamment à l'imipénème et méropénem, lorsqu'il est associé à divers carbapénémases de classe D (Gordon et Wareham, 2010), (Coyne et al., 2011).

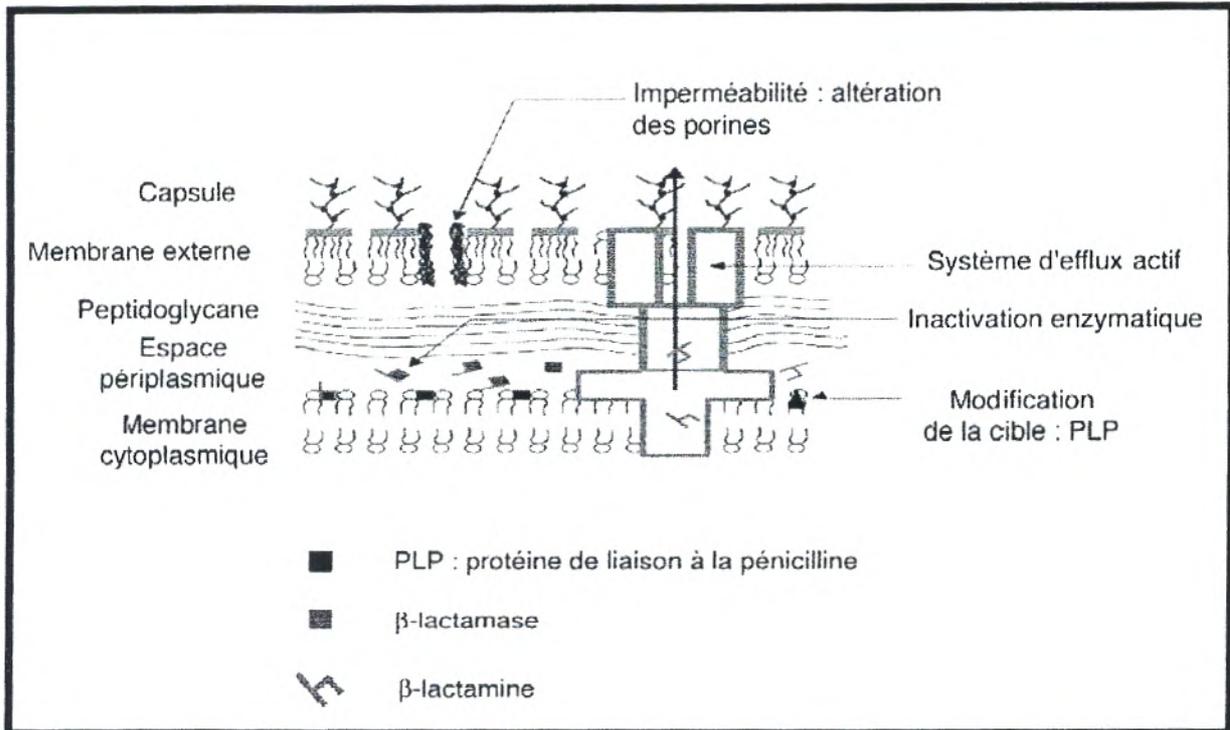


Figure 5. Représentation schématique des principaux mécanismes de résistance aux bêta-lactamines des bactéries Gram négatif (Cavallo et al., 2004).

### 2.2 Résistance acquise aux aminosides

La présence de gènes codant pour des enzymes modifiant l'aminoglycoside dans les intégrons de classe 1 est très répandue dans les souches d'*A. baumannii* multirésistantes. Toutes les classes d'enzymes majeures ont été décrites, y compris acétyltransférases, nucleotidyltransférases et phosphotransférases (Peleg et al., 2008). Plus récemment, des méthylations de l'ARNr 16S par des méthylases codées par le gène (*ArmA* et *RmtA*), a été décrit chez des souches d'*A. baumannii* isolées au Japon, en Corée et aux États-Unis. Ce mécanisme de résistance émergente altère la liaison d'aminoglycoside à son site cible et confère à haut niveau de résistance à tous les aminosides cliniquement utiles (Decré, 2012). La résistance aux aminosides est également associée à des mécanismes d'efflux impliquant la pompe AdeABC et la pompe AbeM de la famille MATE (Coyne et al., 2011).

### 2.3 Résistance acquise aux quinolones

La résistance d'*A. baumannii* aux quinolones est souvent causée par des modifications structurales de la cible des quinolones que sont les topoisomérases de type II (ADN gyrase) et topoisomérase IV, qui du à des mutations au niveau des gènes codant pour une sous-unité de l'ADN gyrase *gyrA*, ou pour une sous-unité de la topoisomérase IV, *ParC* (Peleg et al., 2008). Ces modifications se traduisent en une plus faible affinité pour la liaison de la famille des quinolones pour le complexe enzyme-ADN (Perez et al., 2007).

Les systèmes d'efflux de type RND AdeABC, et AdeFGH contribuent également à la résistance aux fluoroquinolones chez *A. baumannii*. AdeFGH se trouve dans 90% des isolats cliniques, et sa surexpression qui est due à des mutations dans le gène *adeL*, situés en amont de AdeFGH est responsable de haut niveau de résistance au fluoroquinolones (Rosenfeld et al., 2012).

Le système d'efflux de type MATE (AdeM) joue aussi un rôle dans la résistance aux fluoroquinolones chez *A. baumannii* (Decré, 2012).

### 2.4 Résistance acquise aux autres antibiotiques

▪ La colistine, de la classe des polymyxines, est un peptide cationique qui agit en perturbant les membranes chargées négativement des bactéries Gram négatif, reste parfois le seul antibiotique disponible dans le cas des infections à *A. baumannii* multirésistantes. La résistance à la colistine reste rare, cependant un système de régulation à deux composantes PmrAB est impliqué dans la résistance à la colistine chez *A. baumannii* (Adams et al., 2009).

▪ La rifampicine possède une activité intéressante sur *A. baumannii*, mais les risques de mutations vers la résistance sont élevés. Par ailleurs, un gène de résistance *arr-2* codant pour une ADP-ribotryl-transférase a été identifié au sein d'un intégron de classe 1, la rifampicine est également sensible au système d'efflux de type RND AdeIJK (Decré, 2012).

▪ Deux mécanismes différents de résistance aux tétracyclines ont été largement décrits dans *A. baumannii* : un système d'efflux Tet ; tetA et tetB médiées par des transposons, TetB détermine à la fois l'efflux à la tétracycline et la minocycline, tandis que TetA ne pilote que l'efflux de tétracycline. Le second mécanisme est le système de protection ribosomique, une protéine codée par le gène tetM protège le ribosome de l'action de tétracycline, la doxycycline et la minocycline (Perez et al., 2007). La résistance intrinsèque à la tétracycline a été également associée à la surexpression des systèmes d'efflux de type RND AdeABC (Gordon et Wareham, 2010).

## Synthèse bibliographique

---

▪ *Acinetobacter* est naturellement résistant à bas niveau au triméthoprim, la résistance à haut niveau est due à l'acquisition d'un gène de résistance, *dhfrI*, porté par un plasmide qui porte également des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la kanamycine, à la streptomycine et au sulfaméthoxazole. La résistance au triméthoprim est également associée à l'expression des systèmes d'efflux de type RND AdeABC et AdeIJK par *A. baumannii* **(Decré, 2012)**.

▪ *A. baumannii* est naturellement résistante au chloramphénicol. La résistance acquise à haut niveau observée chez certains isolats cliniques est due à la production d'une acétyltransférase dont le gène peut être flanqué de séquences d'insertion permettant l'amplification du gène **(Decré, 2012)**. Ce mécanisme peut être combiné à l'action des systèmes d'efflux de type RND AdeABC **(Gordon et Wareham, 2010)**.

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel biologique

#### ➤ Souches étudiées

L'objectif de ce travail est d'étudier les souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à partir du service de traumatologie et de médecine interne au niveau du CHU de Tlemcen.

#### ➤ Souches de références

- ATCC 25922 : *Escherichia coli* sensible aux carbapénèmes.
- ATCC 27853 : *Pseudomonas aeruginosa* productrice de M $\beta$ L VIM.
- KP Nasey : *Klebsiella pneumoniae* productrice de M $\beta$ L NDM.

### 1.2. Milieux de culture

#### ➤ Liquide

- BHIB : Bouillon au cœur cervelle (Fluka).
- Eau physiologique stérile.

#### ➤ Solide

- Mac Conkey (Fluka).
- Gélose nutritive (Fluka).
- Milieu triple sucres (MERCH Gelose TSI).
- Mueller Hinton (Fluka).

### 1.3. Solutions tampons

- Solution de l'EDTA 0,5 M pH 8.
- Solution de TBE 0,5M.

### 1.4. Antibiotiques

#### ➤ Poudre

- Bêta-lactamines : Céfotaxime (Glaxo Smith Kline),
- Quinolones : Ciprofloxacine (Bayer Pharma).
- Aminosides : Amikacine (Bristol-Myers Squibb).

#### ➤ Disques (Bio Rad)

- Bêta-lactamines : Ticarcilline (TIC : 75 $\mu$ g), Ticarcilline/acide clavulanique (TCC : 10 $\mu$ g), Pipéracilline (PIP : 75  $\mu$ g), Aztreonam (ATM : 30 $\mu$ g), Imipénème (IPM : 10 $\mu$ g), Cefotaxime (CAZ : 30 $\mu$ g).
- Fluoroquinolones : Ciprofloxacine (CIP : 5 $\mu$ g).
- Aminosides : Amikacine (AK : 30 $\mu$ g), Tobramycine (TOB : 10 $\mu$ g), Gentamicine (GEN : 10 $\mu$ g).

- Polymyxines : Colistine (CS : 50µg).

### 1.5. Test biochimique

- Galerie API 20 NE (Bio Mérieux).
- Disques d'oxydase (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.).
- Milieu TSI.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Prélèvements

Les différents prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage sur patients et au niveau de l'environnement, ainsi que par récupération des sondes urinaires et des cathéters. Ces prélèvements sont mis dans des tubes de bouillon nutritif pour être incubés à 37°C pendant 24 heures afin d'assurer la multiplication des souches.

### 2.2. Isolement et purification

L'ensemencement des souches a été réalisé par épuisement sur le milieu Mac Conkey pour l'isolement des bactéries à Gram négatif. Le milieu ensemencé est incubé à 37°C pendant 24h. Plusieurs passages des colonies bactériennes sur le même milieu gélosé sont nécessaires pour l'obtention des souches pures à identifier.

### 2.3. Identification

L'identification a été réalisée à l'aide du test d'oxydase ; test TSI (milieu triple sucres) et par la galerie API 20NE à partir des cultures pures.

#### 2.3.1. Test d'oxydase

L'oxydase est une enzyme recherchée en bactériologie systématique. Sa présence ou son absence représente un des critères systématiques les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bacilles à Gram négatif.

Ce test est réalisé en déposant des colonies pures sur un disque d'oxydase. Les bactéries positives pour l'enzyme oxydase prennent une rapide coloration violette au contact du réactif. Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont, oxydase négative où y'a pas changement de couleur.

### 2.3.2. Test TSI (milieu triple sucres)

La technique consiste à ensemencer en stries serrées la pente de gélose TSI, puis faire une piqure centrale dans le culot ce qui permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose et saccharose), la production ou non de H<sub>2</sub>S et du gaz à partir du glucose. La lecture se fait après 18 heures d'incubation à 37°C :

- La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune de la surface du culot.
- La fermentation du saccharose et/ou du lactose se traduit par le virage au jaune dans la masse du culot.
- La production de H<sub>2</sub>S se traduit par le noircissement du milieu.

### 2.3.3. Galerie API 20NE

API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

#### ➤ Préparation de la galerie

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

#### ➤ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) ;
- A l'aide d'une pipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique bien isolée sur milieu gélosé, utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures) ;
- Réaliser une suspension en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

#### ➤ Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant ;

- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects ;
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour créer une anaérobiose ;
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.
  - **Lecture de la galerie**
- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (**Annexe 1**) ;
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) ;
- La révélation des tests  $\text{NO}_3$  et TRP se réalisera par l'addition des réactifs ;
- L'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique (**Annexe 2**) ou d'un logiciel d'identification.

### 2.4. Antibiogramme (CA-SFM 2013)

La Société Française de Microbiologie a créé un Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) chargé de déterminer les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques (antérieurement catégories thérapeutiques) et de proposer un guide pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Les valeurs critiques définies pour les concentrations et les diamètres des zones d'inhibition déterminent trois catégories cliniques pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

#### ➤ Technique

- À partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé, préparer une suspension bactérienne en mettant trois à quatre colonies de la souche dans 2 ml d'eau distillée stérile. La suspension doit être de  $10^8$  UFC/ml soit de densité optique 0,08-0,1 à une longueur d'onde de 625 nm ;
- Réaliser une dilution de la suspension précédente au 1/100 ( $\approx 10^6$  UFC/ml) dans 10 ml d'eau distillée stérile, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ;
- La suspension diluée estensemencée par inondation sur des boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton, rejeter l'excès et laisser sécher les boîtes à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 20 à 30 min ;
- Application des disques d'antibiotiques sur les boîtes à l'aide d'une pince stérile. Pour les bêta-lactamines, la disposition des disques suit le schéma de Vedel.

### ➤ Lecture

- Après 18 à 24 heures d'incubation, la lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition afin de déterminer les catégories cliniques selon les valeurs critiques (**Annexe 3**) et classer les bactéries dans l'une des catégories : **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistance**.
- Interpréter les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines.

### 2.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI

La détermination précise de la CMI d'un antibiotique est parfois nécessaire pour compléter les données de l'antibiogramme. La méthode de dilution en milieu solide est la méthode quantitative qui permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

### ➤ Technique

- Préparer pour chaque antibiotique, une série de concentrations selon une progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$ , diluées à partir d'une solution mère d'une concentration de 5120 mg/l (**Annexe 4**) ;
- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans des boîtes de Pétri et 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin ;
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller-Hinton gélosé maintenu en surfusion à 45°C ;
- Homogénéiser et laisser solidifier ;
- Sécher les boîtes à 37°C pendant 30 minutes à l'étuve ;
- Préparer des suspensions de densité de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester, puis les diluer au 1/10. La souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisé comme contrôle au cours de chaque série de détermination ;
- Ensemencer la suspension bactérienne par spot de 2 $\mu$ l, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

### ➤ Lecture

Après 24 heures d'incubation à 37°C, s'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin et déterminer la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle la croissance est inhibée (CMI).

### 2.6. Test à la cloxacilline (Naas et al., 2003)

La cloxacilline est un antibiotique qui permet d'inhiber les bêta-lactamase de type AmpC chromosomique ou plasmidique. La récupération de l'activité d'une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> ou

4<sup>ème</sup> génération en présence de la cloxacilline permet de confirmer la production de la céphalosporinase par la souche.

### ➤ **Technique**

- Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Müller-Hinton additionné de cloxacilline de concentration 500 µg/ml (2ml de cette concentration et 18ml de Mueller-Hinton) ;
- Dans ce cas il faut dissoudre 0,25g de cloxacilline dans 25ml d'eau distillée stérile pour préparer une concentration de 10000µg/ml puis procéder à une dilution à 500µg/ml.

### ➤ **Lecture**

La lecture se fait en comparant les boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton simple et celles contenant les géloses supplémentées de la cloxacilline. Le résultat positif est noté lorsqu'une augmentation des diamètres d'inhibition, d'au moins 8 mm autour des disques de céftazidime CAZ est observée.

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

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

### ➤ **Technique**

- Ensemencer par écouvillonnage une suspension d'*Escherichia coli* 25922 de 10<sup>8</sup> UFC/ml (sensible aux carbapénèmes) sur gélose Mac Conkey ;
- Appliquer sur la gélose sous forme de stries la souche à tester à partir du centre de la boîte jusqu'à la périphérie de la boîte, ainsi que la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 productrice de MβL VIM ;
- Sécher la boîte pendant 15 minutes ;
- Déposer un disque d'imipénème au centre de la boîte ;
- Incuber à 37°C pendant 18 heures.

### ➤ **Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par échancre de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (**figure 7**).

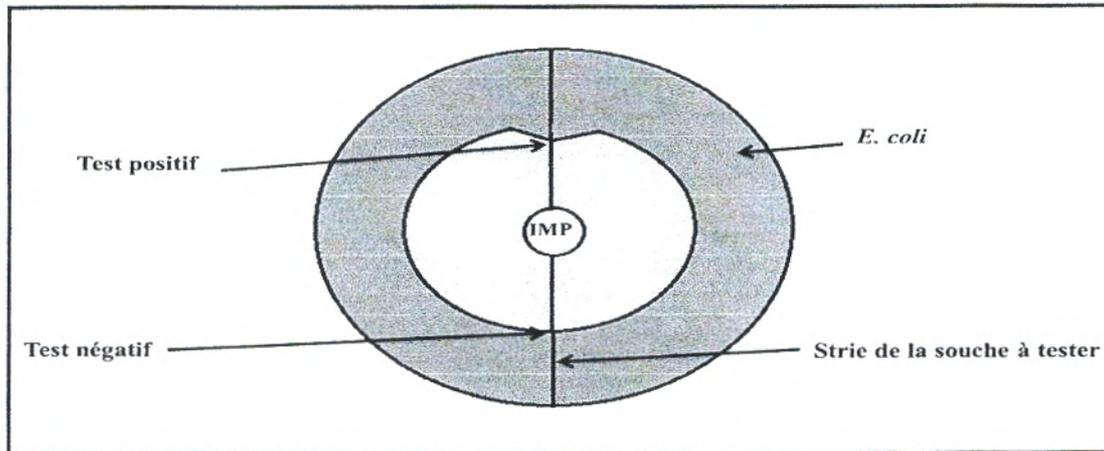


Figure 6. Lecture du test de Hodge (Lee et al., 2003)

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

Ce test permet de rechercher les métallo-bêta-lactamases (M $\beta$ L) sur les souches résistantes au carbapénèmes à l'aide de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA),

#### ➤ Technique

- Ensemencer l'inoculum bactérien sur gélose Muller-Hinton ;
- Déposer 4 $\mu$ l d'EDTA 0,5 M, pH 8 sur un disque d'imipénème, et 10 $\mu$ l d'EDTA sur un disque blanc (Papier Whatman). Les deux disques sont placés à 15 mm bord à bord de deux disques d'imipénème ;
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C ;

#### ➤ Lecture

L'observation d'une image de synergie, ainsi qu'une augmentation de la zone d'inhibition d'IPM-EDTA par rapport à l'IPM seul veut dire que la souche testée est productrices de M $\beta$ L.

### 2.9. E-test (Joffin et Leyral, 2006)

C'est un test complémentaire pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

#### ➤ Technique

- Ensemencer l'inoculum bactérien sur gélose Muller-Hinton ;
- Déposer au centre la Bandelette E-test qui comporte des concentrations croissantes d'antibiotique IMP allant de 0,02 à 32  $\mu$ g/ml.

#### ➤ Lecture

Après incubation de 24h à 37°C, la valeur lisible à la zone d'intersection entre la bandelette et l'ellipse de croissance bactérienne correspondra à la CMI.

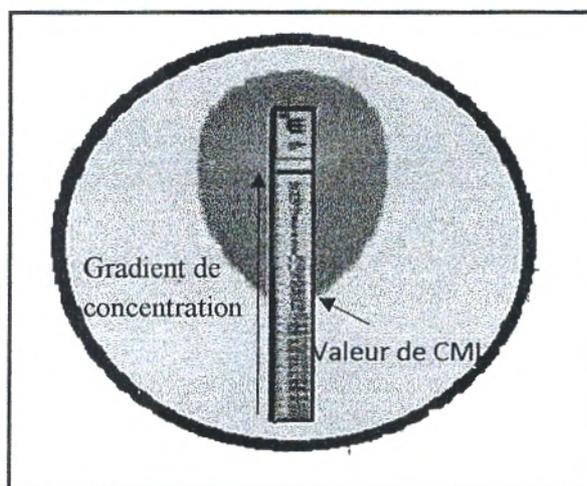


Figure 7. Lecture d'E-test ((Joffin et Leyral, 2006)

### 2.10. PCR (Polymerase Chain Reaction) (Vézina, 2009)

En biologie moléculaire, une des techniques les plus élémentaires, est la PCR, qui est utilisée dans le but d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier, pour notre étude on a réalisé cette technique afin d'identifier les gènes codant pour les métallob-lactamases de type NDM à activité carbapénémase des souches résistantes à l'imipénème.

#### ➤ Préparation du milieu réactionnel

Le volume réactionnel final (25 $\mu$ l) est composé de : 12,5 $\mu$ l de quantitaq, 0,5 $\mu$ l d'amorce F, 0,5 $\mu$ l d'amorce R, 6,5 $\mu$ l d'eau ultra pure et 5 $\mu$ l d'ADN (1 colonie pure + 200  $\mu$ l d'eau ultra pure).

#### ➤ Les étapes de la PCR

La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée dans un thermocycleur pendant 3 heures où se déroule en trois étapes :

- Première étape : 95°C pendant 15min
- Deuxième étape : 94°C pendant 1 min  
55°C pendant 50 secondes  
72°C pendant 1min, 30 seconde
- Troisième étape : 72°C pendant 7min  
4°C jusqu'à la fin du temps

## Matériel et méthodes

---

### ➤ Migration sur gel d'agarose

- Préparation du gel d'agarose avec 1g d'agarose et 100 ml de TBE 0,5X et 200µl de BET ;
- mettre le gel dans la cuve pour qu'il devient solide ;
- Charger le premier puits avec 4µl de marqueur (Bench top pGEM DNA Markers-promega) et les autres puits avec 4µl des produits PCR ;
- Les produits d'amplification ont été visualisés après migration sur gel d'agarose.

# RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Résultats

### 1.1. Prélèvement

83 prélèvements ont été effectués pendant la période d'étude allant du mois d'avril au Juin 2013, ayant porté sur 40 patients au cours de leur hospitalisation dans les services de traumatologie et de médecine interne au niveau de CHU de Tlemcen et à partir de leur environnement (Tableau 2).

Tableau 2. Les différents prélèvements réalisés dans les deux services

| Service          | Prélèvements |           | Patients |           |           | Environnement | Total |
|------------------|--------------|-----------|----------|-----------|-----------|---------------|-------|
|                  | Plaie        | Urinaire  | cathéter | Divers    |           |               |       |
| Traumatologie    | 11           | 5         | 5        | 5         | 18        | 44            |       |
| Médecine interne | 0            | 7         | 4        | 11        | 17        | 39            |       |
| <b>Total</b>     | <b>11</b>    | <b>12</b> | <b>9</b> | <b>16</b> | <b>35</b> | <b>83</b>     |       |

Par rapport au total de 96 bacilles à Gram négatif (BGN) identifiées, 71 souches appartenant à la famille des entérobactéries et 25 au groupe des non fermentants (figure 8).

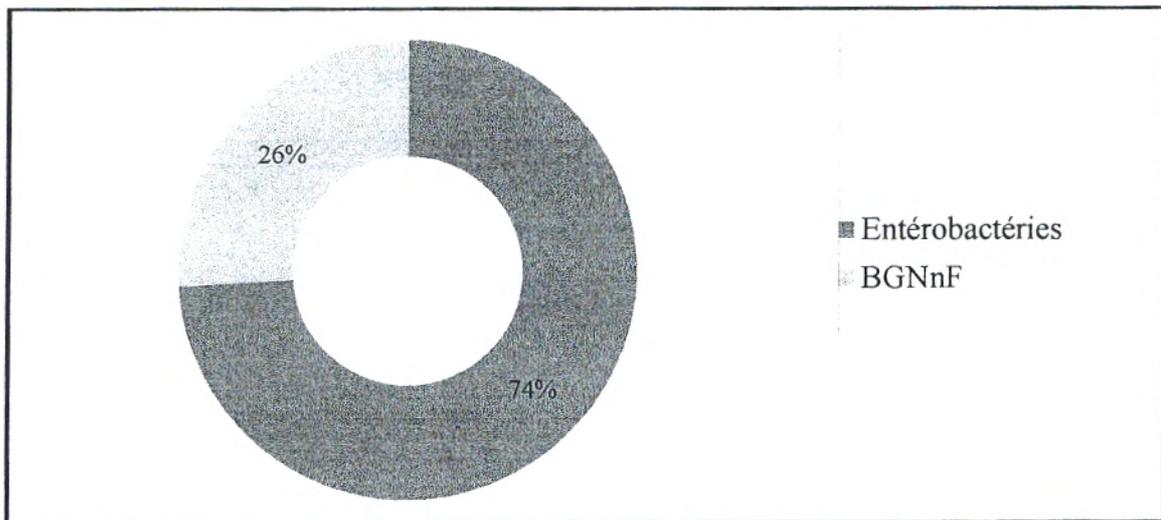
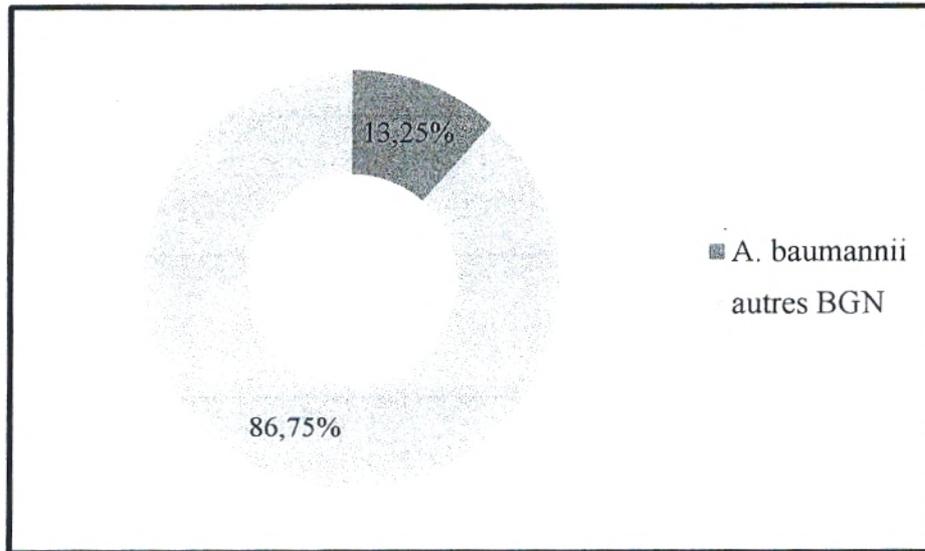


Figure 8. Répartition des bacilles à Gram négatif à partir des prélèvements

*Par rapport aux*

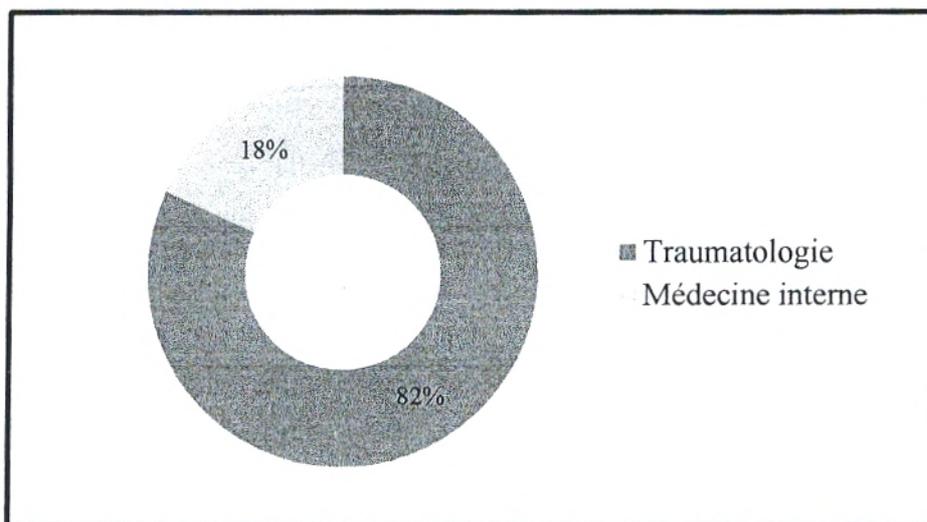
## RESULTATS ET DISCUSSION

13,25% c'est la fréquence d'isolement d'*Acinetobacter baumannii*, ce qui correspond à 11 souches identifiées parmi un total de 96 bacilles à Gram négatif (**figure 9**).



**Figure 9.** Fréquence d'isolement d'*Acinetobacter baumannii*

82% de souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été isolées au niveau du service de traumatologie, alors que le taux d'isolement atteint au niveau du service de médecine interne est de 18% (**Figure 10**).



**Figure 10.** Répartition d'*Acinetobacter baumannii* en fonction des services

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le taux d'isolement d'*Acinetobacter baumannii* varie aussi selon les sites de prélèvement, où elle a été abondamment isolée à partir des prélèvements effectués sur patients, dont le principal site d'isolement est le prélèvement urinaire (36,7%), suivi de celui de plaie et cathéter qui ont le même pourcentage (18%). Par contre, dans l'environnement seulement 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été isolées avec 18% (**Figure 11**).

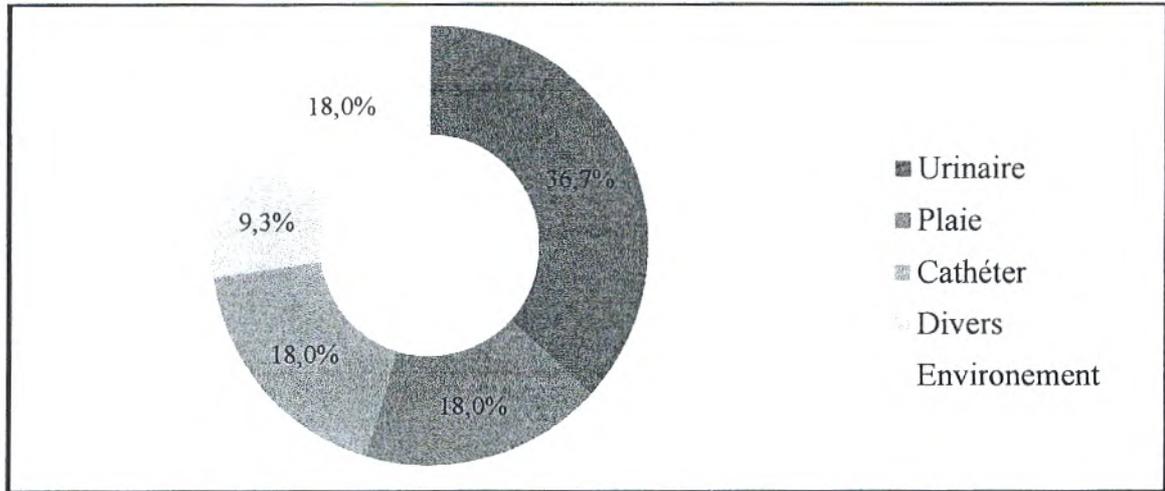


Figure 11. Répartition d'*Acinetobacter baumannii* en fonction des sites de prélèvement

### 1.2. Identification d'*Acinetobacter baumannii*

L'identification d'*Acinetobacter baumannii* a été faite à l'aide de la galerie API 20NE (**Figure 12**) après la révélation d'oxydase négatif par le test d'oxydase et fermentation négatif par le test TSI.

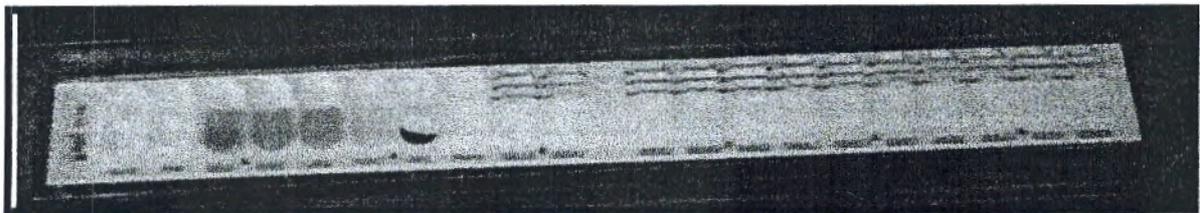


Figure 12. Plaque API 20NE d'*Acinetobacter baumannii*

### 1.3. Résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques

#### 1.3.1 Résultats d'antibiogramme

Toutes les souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été testées vis-à-vis 11 molécules d'antibiotiques appartenant à 4 familles différentes dont 6 bêta-lactamines, 3 aminosides, 1 quinolone et la colistine.

La résistance des souches aux bêta-lactamines était très importante avec un taux de 100% à l'aztréonam et ceftazidime, 63,63% à la piperacilline, ticarcilline et ticarcilline+ acide

## RESULTATS ET DISCUSSION

clavulanique. L'imipénème reste la molécule la plus active par rapport aux antibiotiques précédents avec 18,18% (Figure 13, Annexe 5).

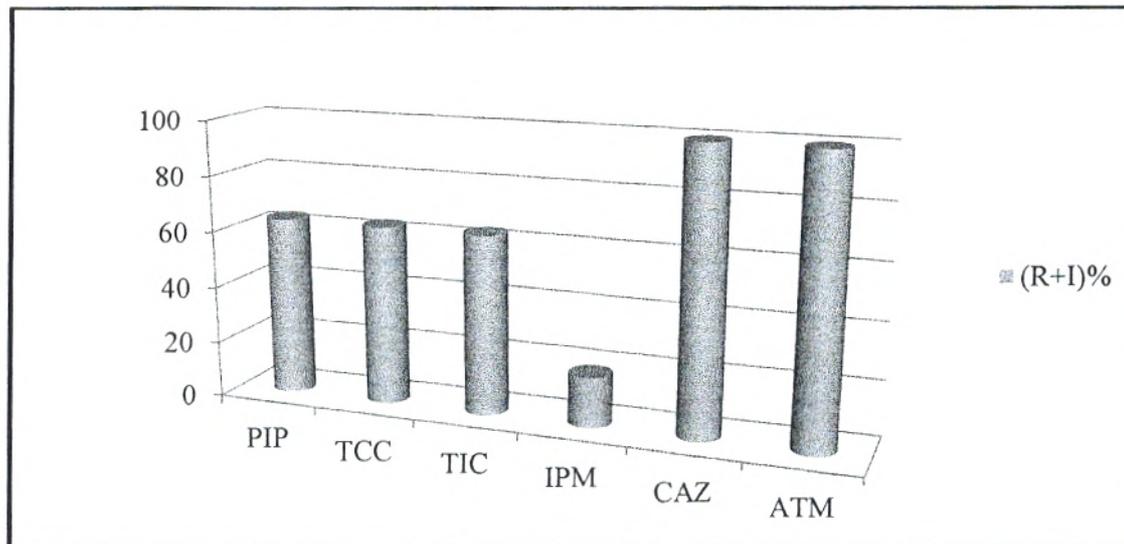


Figure 13. Taux de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux bêta-lactamines

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* ont montré une résistance aux aminosides avec un taux de 54,54% à la gentamicine et tobramycine et 45,45% à l'amikacine.

La ciprofloxacine (quinolone) conserve son activité avec un taux de résistance de 27,27%.

La colistine demeure le seul antibiotique potentiellement efficace avec 100% de souches sensibles (Figure 14, Annexe 5).

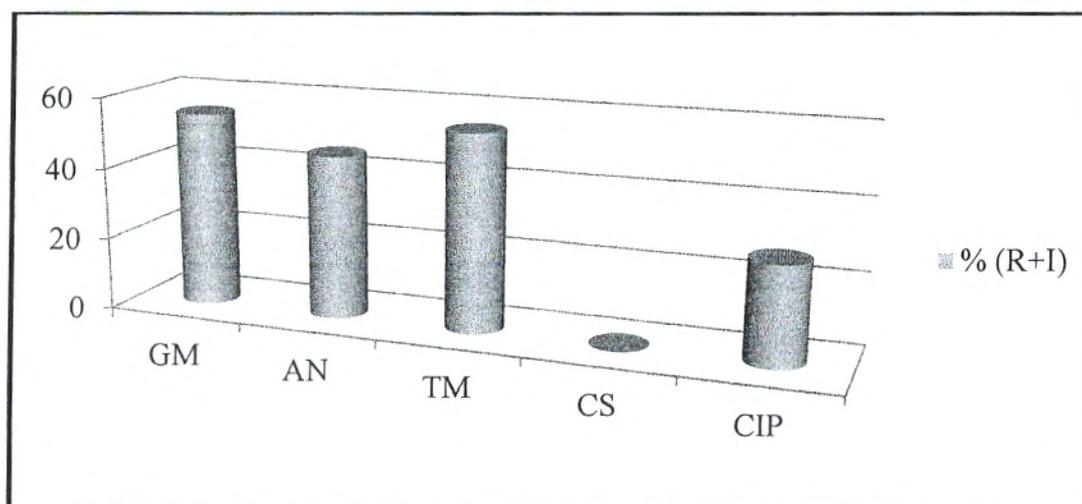


Figure 14. Pourcentage de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux autres classes d'antibiotiques

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse globale des résultats d'antibiogramme a montré une différence de taux de résistance au sein de deux services, en effet pour la majorité des antibiotiques testés, le taux de résistance sont plus importants au niveau du service de traumatologie par rapport au celui de la médecine interne, où 78% de souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à partir du service de traumatologie ont montré un antibiotype multirésistant (MDR), alors que ce taux set de 0% au niveau du deuxième service (Figure 15).

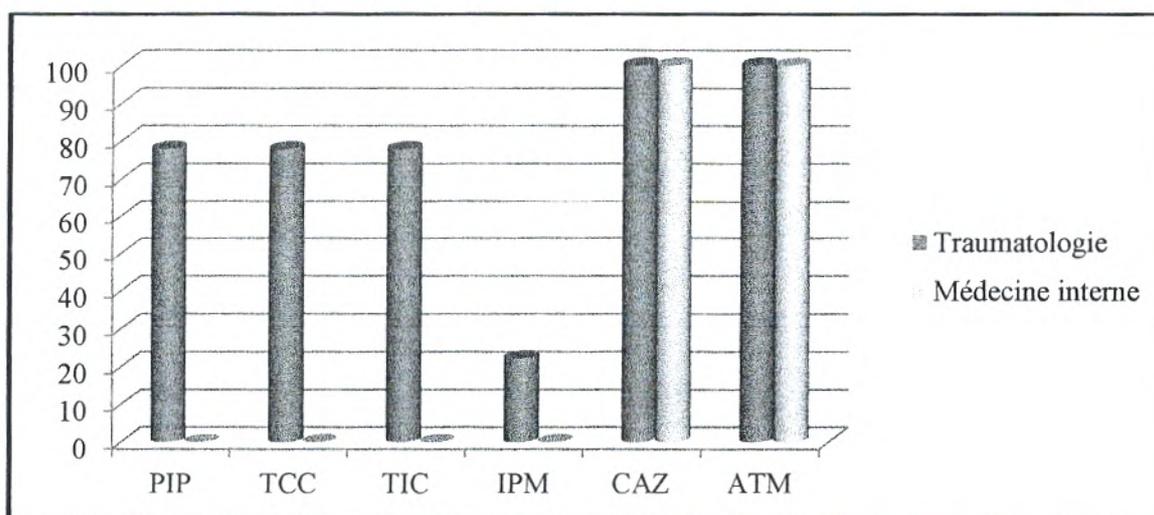


Figure 15. Pourcentage de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux bêta-lactamines au niveau de deux services

L'analyse du comportement de chaque souche vis-à-vis aux bêta-lactamines testées nous a permis de distinguer 3 phénotypes : phénotype sensible (36,36%), phénotype multirésistant excepté à l'imipénème (45,45%), phénotype multirésistant y compris à l'imipénème (18,18%) (Figure 16).

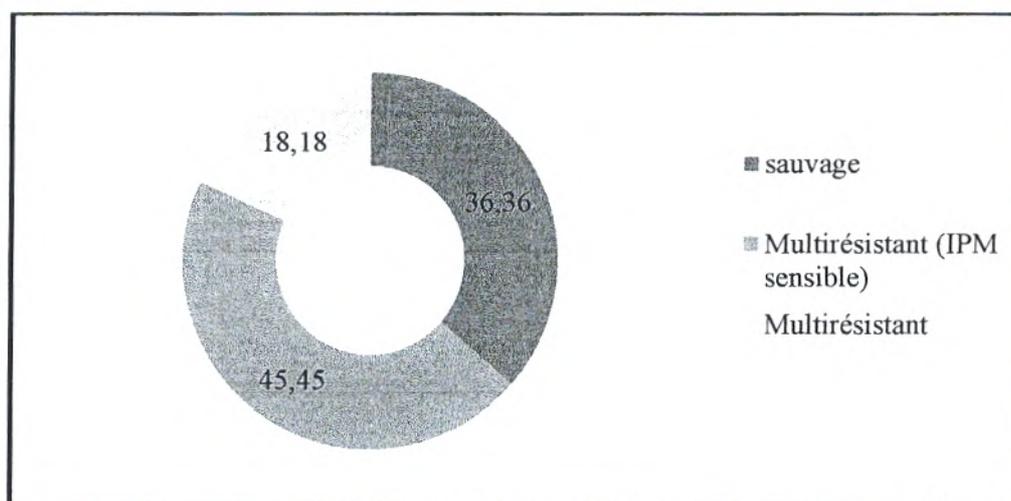


Figure 16. Répartition des phénotypes de résistance des souches d'*A. baumannii*

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1.3.2. Déterminations des niveaux de CMI

64% des souches étudiées sont résistantes à la majorité des bêta-lactamines testées, les souches multirésistantes montrent de hauts niveaux de CMI pour la ceftazidime et l'amikacine (>512µg/ml). Elles présentent aussi une forte résistance au ciprofloxacine avec une valeur de CMI de 64 µg/ml.

Tableau 3. Résultats des CMI des souches d'*Acinetobacter baumannii*

| Souches          | CAZ      | AMK      | CIP     |
|------------------|----------|----------|---------|
|                  | ≤4 >8    | ≤8 >16   | ≤1 >1   |
| multirésistantes | 32- >512 | <1- >512 | 0,5- 64 |

La détermination des CMI pour l'imipénème effectuée par l'E-test pour les souches résistantes à cet antibiotique a montré un niveau de CMI supérieur à 32µg/ml (Figure 17).

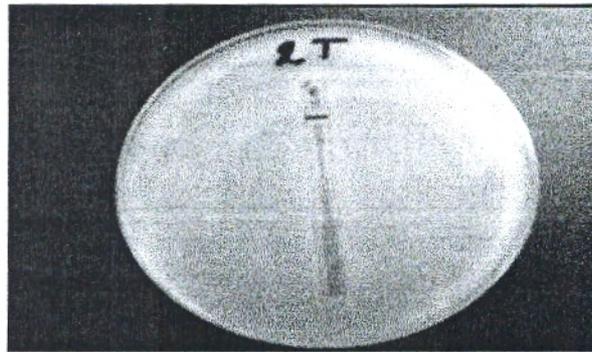


Figure 17. Résultats de l'E-test

### 1.4. Phénotypes de résistance

#### 1.4.1. L'hyperproduction de céphalosporinases

La production de la céphalosporinase est observée lorsqu'il y a une récupération de l'activité des céphalosporinases de troisième génération en présence d'une concentration de la cloxacilline additionnée sur le milieu M.H. La sensibilité à la ceftazidime était restaurée chez 36,4% de souches d'*Acinetobacter baumannii* ce qui indique l'hyperproduction de céphalosporinase par ces souches (Figure 18).

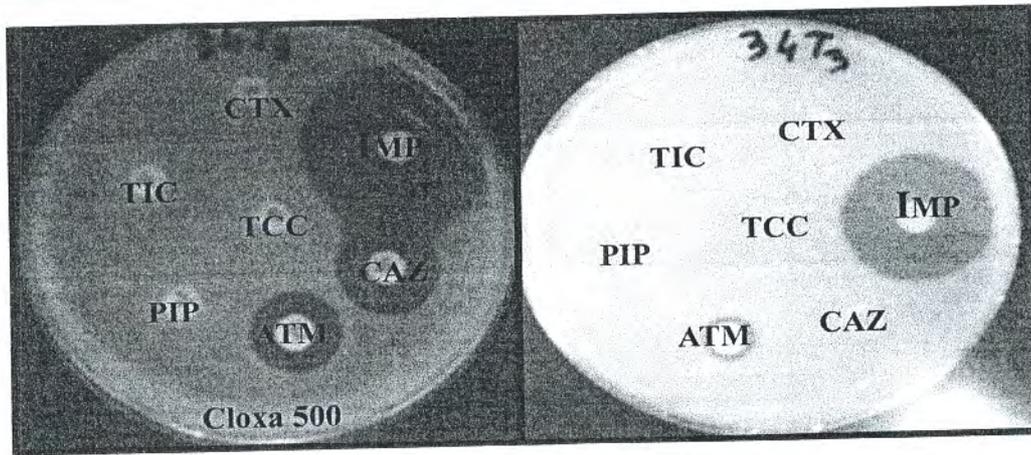


Figure 18. Résultats du test à la cloxacilline

#### 1.4.2. Production de carbapénèmase

Deux souches d'*Acinetobacter baumannii* (18,2%) ont montré une résistance à l'imipénème, pour cela, des tests de Hodge, et de l'IPM-EDTA ont été réalisés afin de détecter d'éventuelle production de carbapénèmase.

Le test de Hodge phénotypique a permis de mettre en évidence l'enzyme à activité carbapénèmase, et ce avec la formation d'échancrure au niveau du diamètre à l'intersection entre la strie et la culture d'*E.coli*. Une souche s'est révélée positif en présentant une résistance à l'imipénème (Figure 19).

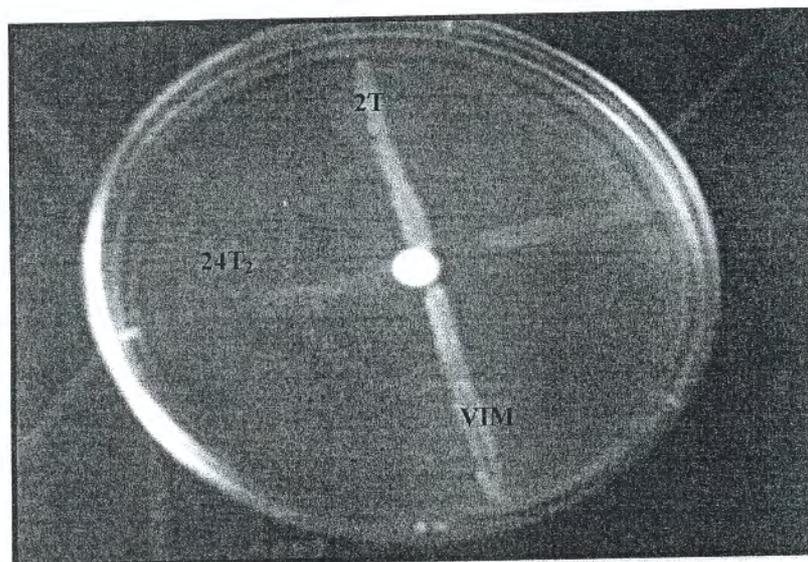
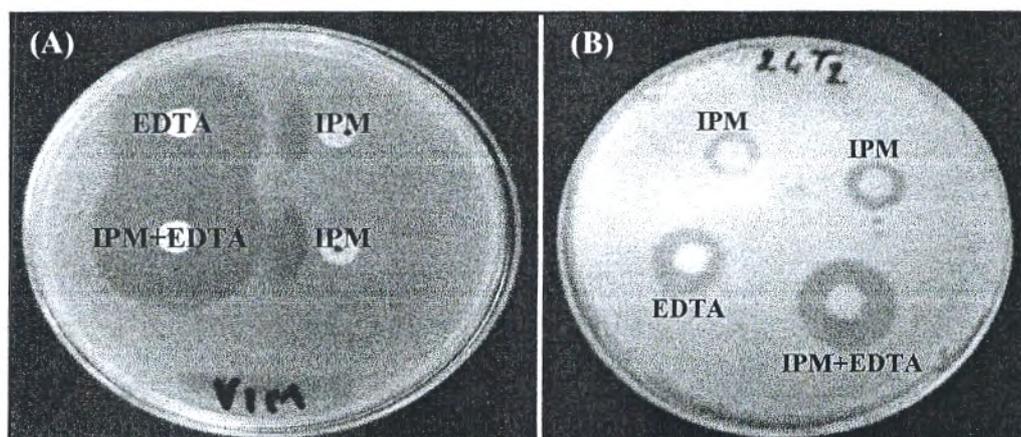


Figure 19. Résultat du test de Hodge

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le test IPM-EDTA est réalisé afin de chercher la présence de M $\beta$ L. Les souches n'ont pas montré d'image de synergie. L'activité des bêta-lactamases n'est pas inhibé par l'action de l'EDTA, donc les souches testées ne possèdent pas de métallobêta-lactamases permettant leur résistance à l'imipénème (**Figure 20**).



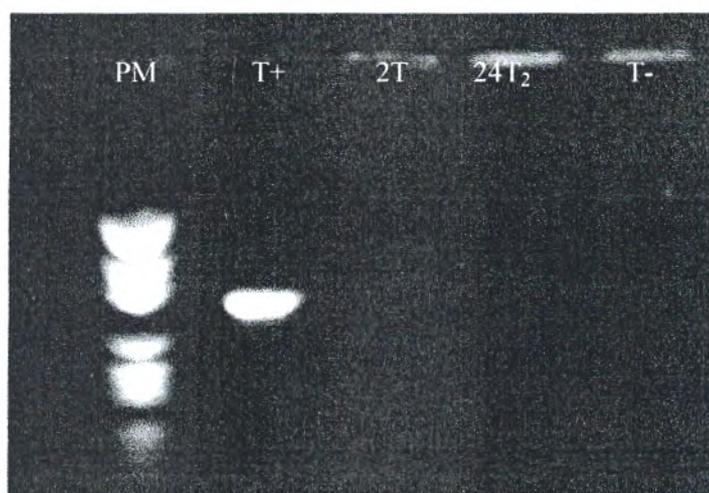
(A) Souche de référence productrice d'une métallobêta-lactamase (VIM-1)

(B) Souche d'*Acinetobacter baumannii* testée

**Figure 20. Résultats du test IPM-EDTA**

### 1.5. Résultats de l'amplification par PCR

Les PCR réalisés afin d'identifier d'éventuels gènes codant pour la résistance à l'imipénème a montré que les souches testées ne sont pas productrices de métallobêta-lactamase de type NDM.



**Figure 21. Profil de migration après amplification du gène NDM**

### 2. Discussion

*Acinetobacter baumannii* est un pathogène émergent important. Il est de plus en plus souvent identifié comme responsable d'infections dans les hôpitaux. Dans notre étude, le taux d'isolement des souches d'*A. baumannii* représentent 13,25% au niveau des services de traumatologie et de médecine interne du CHU de Tlemcen, ce qui est beaucoup plus inférieur que celui d'une étude menée au sein du même laboratoire « LAAPSAB » soit de 50 % réalisée par **Medjahed (2012)** au niveau du service de réanimation, ce qui concorde avec une étude marocaine récente montrée la baisse fréquence de cette bactérie au niveau du centre de traumatologie par rapport au service de réanimation (**Thabet et al, 2013**).

Notre étude a rapportée La prédominance d'*Acinetobacter baumannii* au niveau du service de traumatologie par rapport le service de médecine interne. Où ce germe peut être responsable de surinfections de brûlures, de plaies postopératoires ou traumatiques (**Ben Haj Khalifa, 2009**).

Le pourcentage d'isolement le plus élevé dans notre étude de ce germe était observé dans les prélèvements urinaires. Les voies urinaires sont parmi les principaux sites d'infection dues à *A.baumannii* (**Ramoul et al, 2013**).

L'histoire d'*A. baumannii* est marquée par une évolution impressionnante de la résistance aux antibiotiques en raison de sa capacité à disséminer dans l'environnement hospitalier et à acquérir rapidement des mécanismes de résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques : les bêta-lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones.

Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance élevé de nos souches à la céphalosporine de troisième génération (céftazidime) dont le pourcentage (100%), dépasse celui d'une étude marocaine qui est de 50% (**Soraa et al, 2011**) et 92,7% d'une étude tunisienne (**Thabet et al, 2013**). Le mécanisme de résistance à cette classe d'antibiotique correspond principalement à l'hyperproduction d'une céphalosporinase AmpC (**Howard et al., 2012**), 36,36% de notre isolats se sont révélés positif pour ce mécanisme.

La résistance aux carbapénèmes a augmenté de manière alarmante ces dernières décennies, l'usage abusif de cette classe d'antibiotique dans les services hospitaliers y a largement contribué. Cependant, la résistance à l'imipénème est variable selon les auteurs, dans notre étude la résistance à cette molécule est faible (18,18%) en comparant avec une étude effectuée au sein du même laboratoire (33,3%) (**Drissi et al., 2010 b**) et autre étude américaine (58%) (**Dent et al, 2010**). Le mécanisme enzymatique de résistance à l'imipénème pourrait être lié aux deux enzymes à activité carbapénémase : métallo-bêta-lactamases comme par exemple NDM-1, un médiateur de résistance aux carbapénèmes, a été décrit chez deux patient

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

algériens (**Mesli et al., 2013**) et les oxacillinases comme OXA-58, où dans une étude réalisée par **Drissi (2010 a)**, toutes les souches résistantes à l'imipénème isolées à partir du CHU de Tlemcen étaient porteuses du gène bla<sub>OXA-58</sub>. Pour le premier, le test phénotypique et l'amplification par PCR de notre série se sont révélés négatif et la prévalence de deuxième mécanisme de résistance est de 9,1 %.

Les aminosides et les fluoroquinolones sont actuellement peu utilisés pour le traitement des infections nosocomiales à *A.baumannii*. La résistance à la gentamicine atteint les 100% et à la ciprofloxacine dépasse les 50% (**Lahsoune et al, 2007**). Dans notre étude, le taux de résistance pour la ciprofloxacine est inférieur à celui de la littérature (27,27%) et pour la gentamicine on a constaté une résistance élevée, soit 54,54%.

*A. baumannii* garde encore une bonne sensibilité in vitro à la colistine, un ancien antibiotique abandonné pour sa toxicité potentielle. Aucune résistance à cet antibiotique n'a été retrouvée dans notre étude. En revanche l'augmentation de l'usage de cette molécule pour le traitement des infections à souches multirésistantes d' *A baumannii* en monothérapie serait à l'origine de l'apparition de plus en plus de résistances hétérogènes à la colistine qui poseront un véritable problème dans un proche avenir (**Ben Haj Khalifa et Khedher, 2009**).

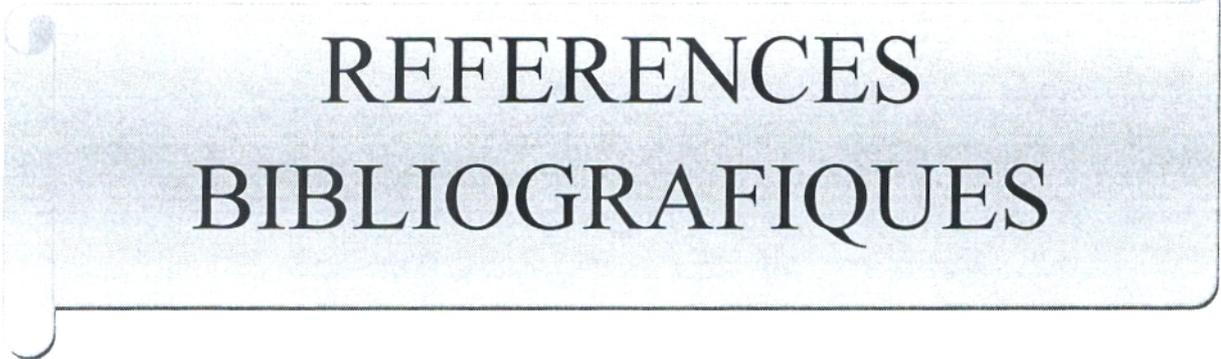
## Conclusion

---

La résistance aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* en milieu hospitalier, pose de sérieux problèmes thérapeutiques, il est donc intéressant de voir que cette espèce dispose d'un arsenal extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action antibiotique. D'après les résultats de notre étude, il apparaît que la fréquence des souches multirésistantes au niveau des services de traumatologie et de médecine interne de notre CHU est importante.

En effet la fréquence élevée des souches résistantes au céftazidime est un problème marquant surtout au niveau du service de traumatologie, où l'antibiotique le plus souvent prescrit est la céphalosporine de première génération. La pression de sélection exercée par l'usage de cette classe d'antibiotique serait à l'origine de l'émergence inquiétante de cette résistance.

La prescription de première intention, ou empirique non documentée par les données bactériologiques serait à l'origine de l'émergence préoccupante de souches d'*A.baumannii* multirésistantes. À côté de l'antibiothérapie, les procédures d'hygiène (lavage des mains), nettoyage soigneux des surfaces, dépistage des patients porteurs, sont d'importants éléments à considérer.



REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

---

1. **Adams M.D., Nickel G.C., Bajaksouzian S. et al., 2009.** Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; Volume 53, N. 9, P. 3628-3634.
2. **Adam Y., Boudet-Dalbin R., Brion J.D. et al., 1992.** Médicaments antibiotiques. Traité de chimie thérapeutique. Editions Lavoisier TEC&DOC. Paris; Volume 2.
3. **Barrial K. et Scotet J., 2006.** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles gram négatif. Thèse des bactériologies. Perspectives d'évolution. Encadrement Dr Tigaud S. pp12.
4. **Battegay M. et Widmer A., 2010.** Nouvelles bactéries à Gram négatif résistantes Alarmisme ou menace réelle? *Forum Med Suisse*; 10 (51–52), 916–917.
5. **Ben Haj Khalifa A. et Khedher M., 2009.** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées dans la région de Mahdia. *Médecine et maladies infectieuses*. Masson (Article in Press). Modele+ MEDMAL-2925, N.3
6. **Bergogne-Bérézin E. et Towner K.J., 1996.** *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin. Microbiol. Rev* ; Volume 9, N. 2, P. 148–165.
7. **Bolon M.K., 2011.** The Newer Fluoroquinolones. *Med Clin N Am* 95, 793–817.
8. **Boyer A., Clouzeau B., Mzali F., Hilbert G. et Gruson D., 2011.** Les nouvelles résistances aux antibiotiques. JARCA.
9. **Bryskier A., 1999.** Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Edition Ellipses, Paris.
10. **Cambau E. et Guillard T., 2012.** Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*; Volume 31(1), 65-76.
11. **Camp C. et Owatha I.T., 2010.** A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Labmedicine* ; Volume 41, N. 11.
12. **Carle S., 2009.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel* ; Volume 42, Supplement 2.
13. **CA-SFM, 2013.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm-microbiologie.org/>.
14. **Cattoir V., 2008.** Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *Mapar ; Pathologie infectieuse en réanimation*. Paris.
15. **Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E., 2004.** Bêtalactamines, EMC- *Maladies Infectieuses* 1, 129–202.

## Références bibliographiques

---

16. **Corvaglia A.R., 2006.** Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres "*Aeromonas*", "*Acinetobacter*" et "*Legionella*". Thèse de doctorat : Univ. Genève, no. Sc. 3796.
17. **Coyne S., Courvalin P. et Périchon B., 2011.** Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ; volume 55, N. 3, P. 947–953.
18. **Decré D., 2012.** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Revue Francophone des laboratoires* ; N. 441.
19. **Dent L., Marshall D.R., Pratap S. et Hulette R.B., 2010.** Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* : a descriptive study in a city hospital. *BMC Infectious Diseases* ; 10 :196.
20. **Dijkshoorn L., Nemec A. et Seifert H., 2007.** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews* ; volume 5.
21. **Drissi M., Poirel L., Mugnier P.D., Baba Ahmed Z. et Nordmann P., 2010a.** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* ; Volume 29, N. 11, P. 1475-1458.
22. **Drissi M., Sefraoui I. et Souna D., 2010 b.** Résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non fermentants au niveau de l'hôpital de Sidi Bel Abbes (Algérie). *Microbiol. Hyg. Alim* ; Volume 22, N. 65.
23. **Figueiredo S., 2011.** *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénèmases. Thèse de doctorat en Bactériologie. Université Paris-Sud11.
24. **Gauzit R., 2011.** Actualités en antibiothérapie-Aminosides toujours et encore : bon usage et suivi thérapeutique. SRLF et Springer-Verlag France.
25. **Giamarellou H., Antoniadou A. et Kanellakopoulou K., 2008.** *Acinetobacter baumannii* : a universal threat to public health ? *International journal antimicrobial agent* 32, 106-119.
26. **Gordon N.C. et Wareham D.W., 2010.** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents* 35, 219–226.
27. **Grall N., Andremont A. et Armand-Lefèvre L., 2011.** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse? *Journal des antinfectieux* ; P.16.
28. **Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. et Sleator R.D., 2012.** *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* ; Volume 3, issue 3.

## Références bibliographiques

---

29. **Jaggi N., Sissodia P. et Sharma L., 2012.** *Acinetobacter baumannii* isolates in a tertiary care hospital: Antimicrobial resistance and clinical significance. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*; 2(2), 57-63.
30. **Jesudason M.V., Kandathil A.J, Balaji V, 2005.** Comparaison of two methods to detect carbapenemase and metallo- $\beta$ -lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res* ; Volume 121, P. 780-783.
31. **Joffin J.N. et Leyral G., 2006.** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome 1. Quatrième édition. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine.
32. **Johannes G., Koeleman M., Jeroen S., Madelon W. et al., 2001.** Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J. Clin. Microbiol* ; Volume 39, N. 1, P. 8–13.
33. **Kempf M., Rolain J., Diatta G., Azza S., Samb B., Mediannikov O. et al., 2012.** Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: The paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. *PLoS ONE* ; Volume 7, Issue 6.
34. **Lahsoune M., Boutayeb H., Zerouali K., Belabbes H. et El Mdaghri N., 2007.** Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. *Médecine et maladies infectieuses* ; Volume 37, P. 828–831.
35. **Lee K., Lim Y.S., Yong D., Yum J.H. et Chong Y., 2003.** Evaluation of the Hodge test and the Imipénème-EDTA Double-Disk Synergie test for differentiating Metallo- $\beta$ -lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* Volume 41, N. 10, P. 4632-4629.
36. **Medjahed H.R., 2012.** Contribution à l'étude de la résistance aux carbapénèmes d'*Acinetobacter baumannii* au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen. Master en biologie, SNV-STU. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
37. **Mesli E., Berrazeg M., Drissi M., Bekkhoucha S.N. et Rolain J.M., 2013.** Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases, IJID-1683*; N. 5.
38. **Naija W., Chemchikh H., Farhat I., Bouallegue O. et al., 2009.** Rifampicine-colistine intraveineuse pour le traitement des infections à *acinetobacter baumannii* multirésistant. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*; Volume 2 : 15-18.
39. **Naas T., L'Hériteau F., Carbone A. et Botherel A., 2003.** Phénotype de résistance aux antibiotiques compatible à celui de la souche d'*Acinetobacter baumannii* AYE\*

## Références bibliographiques

---

- productrice de la  $\beta$ -lactamase VEB-1. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 41, N. 7, P. 3542.
40. **Neuman M., 1979.** Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiotherapiques anti-infectieux. Quatrième édition. Maloine S. A., Paris.
41. **Peleg A.Y., Seifert H. et Paterson D.L., 2008.** *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev* ; Volume 21, N.3, P. 538-582.
42. **Perez F., Hujer A.M., Kristine M., Hujer K.M. et al., 2007.** Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; Volume 51, N.10, P. 3471-3484.
43. **Philippon A. et Arlet G., 2006.**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin* ; 64(1) : 37-51.
44. **Poirel L. et Nordmann P., 2006.** Résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques*; 8 : 100-107.
45. **Ramoul A., Hammami S., Dekhil M., Aimiri S. et al., 2013.** Phenotypic and genotypic characterization of clinical multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from Algerian intensive care units. *African Journal of Microbiology Research* Volume 7(10), pp. 868-874.
46. **Rosenfeld N., Bouchier C., Courvalin P. et Périchona B., 2012.** Expression of the Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by AdeN, a TetR-Type Regulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; Volume 56, N. 5, P. 2504-2510.
47. **Soraa N., Zougaghi L., Zahlane K., Admou B., Haouach K., Kachach M. et Chabaa L., 2011.** Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémocultures dans un centre hospitalo universitaire marocain. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, Volume 5, N. 2, P. 78 – 81.
48. **Thabet L., Zoghlami A., Boukadida J., Ghanem A. et Messadi A.A., 2013.** Etude comparative de la résistance aux antibiotiques des principales bactéries isolées au service de Réanimation de brûlés durant deux périodes (2005-2008, 2008-2011) et dans deux structures hospitalières (Hôpital Aziza Othmana, Centre de traumatologie et grands brûlés). *La tunisie Medicale*; Volume 91, N. 2, P. 138-142.
49. **Vézina L., 2009.** Test PCR (Polymerase chain reaction ou Réaction en chaîne par polymérase). Laboratoire de diagnostic en phytoprotection (MAPAQ).
50. **Wolff M., Joly-Guillou M.L. et Pajot O., 2009.** Les carbapénèmes. *Réanimation* ; 18, S199-S208.

## Références bibliographiques

---

51. **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et Ouarkorich M.N., 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb N. 91.

# ANNEXES

Annexe1. Tableau de lecture des résultats de la galerie 20NE

| Tests           | Composants actifs                   | QTE<br>(mg/cup.) | Réactions/enzymes                  | Résultats                    |                       |
|-----------------|-------------------------------------|------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
|                 |                                     |                  |                                    | Négatif                      | Positif               |
| NO <sub>3</sub> | Potassium nitrate                   | 0,136            | Réduction des nitrates en nitrites | NIT 1+NIT 2 / 5min           |                       |
|                 |                                     |                  |                                    | incolore                     | Ros-rouge             |
|                 |                                     |                  | Réduction des nitrates en azote    | Zinc / 5min                  |                       |
|                 |                                     |                  |                                    | rose                         | Incolore              |
| TRP             | L-tryptophane                       | 0,2              | Formation d'indole                 | JAMES/immédiat               |                       |
|                 |                                     |                  |                                    | Incolore/vert/<br>Pale/jaune | Rose                  |
| GLU             | D-glucose                           | 1,92             | fermentation                       | Bleu à vert                  | Jaune                 |
| ADH             | L-arginine                          | 1,92             | Arginine dihydrolase               | jaune                        | Orange/rose/<br>rouge |
| URE             | urée                                | 0,76             | uréase                             | jaune                        | Orange/rose/<br>rouge |
| ESC             | Esculine citrate de fer             | 0,56<br>0,072    | Hydrolyse (β-glucosidase)          | jaune                        | Gris/marron/<br>noir  |
| GEL             | Gélatine (origine bovine)           | 0,6              | Hydrolyse (protéase)               | Pas de diffusion de pigment  | Diffusion du pigment  |
| PNPG            | 4-nitrophényl-β-D-galactopyranoside | 0,22             | B-galactosidase                    | incolore                     | Jaune                 |
| GLU             | D-glucose                           | 1,56             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| ARA             | L-arabinose                         | 1,4              | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| MNE             | D-mannose                           | 1,4              | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| MAN             | D-mannitol                          | 1,36             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| NAG             | N-acétyl-glucosamine                | 1,28             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| MAL             | D-maltose                           | 1,4              | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| GNT             | Potassium gluconate                 | 1,84             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| CAP             | Acide caprique                      | 0,78             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| ADI             | Acide adipique                      | 1,12             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| MLT             | Acide malique                       | 1,56             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| CIT             | Trisodium nitrate                   | 2,28             | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |
| PAC             | Acide phénylacétique                | 0,8              | assimilation                       | transparence                 | Trouble               |

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

| Familles d'antibiotiques | Antibiotiques testés                 | Signe | Charge des disques | Concentrations critiques (mg/L) |            | Diamètres critiques (mm) |            |
|--------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------|---------------------------------|------------|--------------------------|------------|
|                          |                                      |       |                    | Sensible                        | Résistante | Sensible                 | Résistante |
| <b>β-lactamines</b>      | Ticarcilline                         | TIC   | 75µg               | ≤16                             | >64        | ≥22                      | <18        |
|                          | Ticarcilline+<br>Ac.<br>clavulanique | TCC   | 75/10µg            | ≤16/2                           | >64/2      | ≥22                      | <18        |
|                          | Pipéracilline                        | PIP   | 75µg               | ≤16                             | >64        | ≥18                      | <12        |
|                          | Aztréonam                            | ATM   | 30µg               | ≤4                              | >8         | ≥23                      | <21        |
|                          | Ceftazidime                          | CAZ   | 30µg               | ≤4                              | >8         | ≥21                      | <19        |
|                          | Imipénème                            | IPM   | 10µg               | ≤2                              | >8         | ≥24                      | <17        |
| <b>Aminosides</b>        | Amikacine                            | AN    | 30µg               | ≤8                              | >16        | ≥17                      | <15        |
|                          | Gentamicine                          | GM    | 15µg               | ≤4                              | >4         | ≥16                      | <16        |
|                          | Tobramycine                          | TM    | 10µg               | ≤4                              | >4         | ≥16                      | <16        |
| <b>Quinolones</b>        | Ciprofloxacine                       | CIP   | 5µg                | ≤1                              | >1         | ≥22                      | <22        |
| <b>Polymyxines</b>       | Colistine                            | CS    | 50µg               | ≤2                              | >2         | ≥15                      | <15        |

**Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques**

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

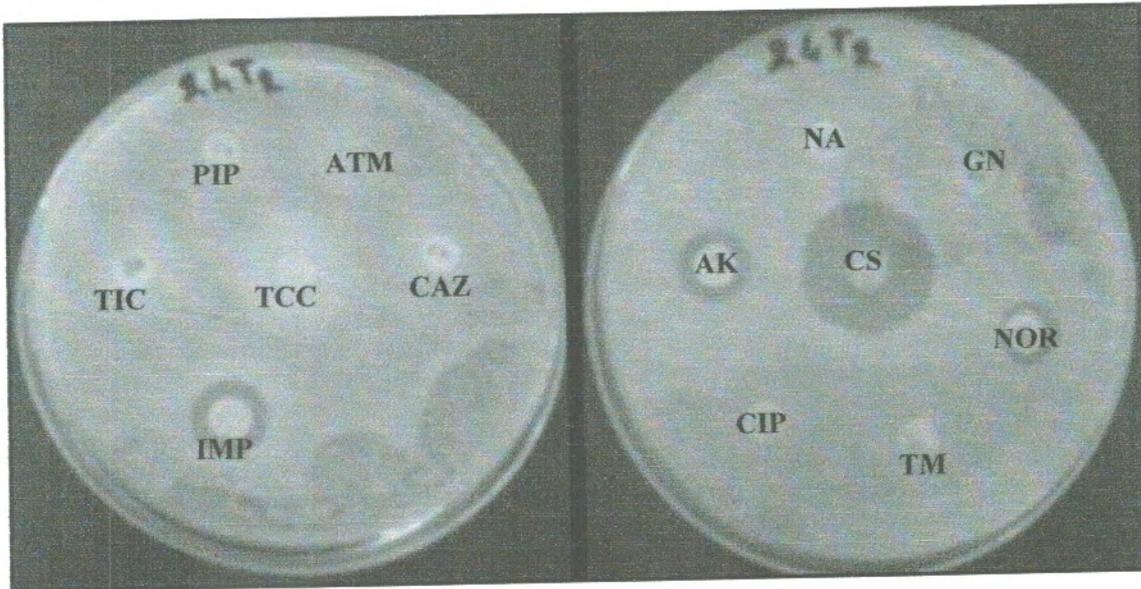
Annexe 5. Résultats de l'antibiogramme des souches d'*Acinetobacter baumannii*

| ANT<br>Souche      | Bêta-lactamines |     |     |     |     |     | Aminosides |    |    | Quinolone | Colistine |
|--------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|----|----|-----------|-----------|
|                    | PIP             | TCC | TIC | IMP | CAZ | ATM | AN         | TM | GM | CIP       | CS        |
| 2T                 | R               | R   | R   | R   | R   | R   | S          | S  | S  | R         | S         |
| 16T <sub>1</sub>   | R               | R   | R   | S   | R   | R   | R          | R  | R  | S         | S         |
| 21T <sub>1</sub>   | S               | S   | S   | S   | R   | R   | S          | S  | S  | S         | S         |
| 22T <sub>2</sub>   | R               | R   | R   | S   | R   | R   | R          | R  | R  | R         | S         |
| 23T <sub>2</sub>   | R               | R   | R   | S   | R   | R   | R          | R  | R  | R         | S         |
| 24T <sub>1</sub>   | R               | R   | R   | S   | R   | R   | R          | R  | R  | S         | S         |
| 24T <sub>2</sub>   | R               | R   | R   | R   | R   | R   | R          | R  | R  | S         | S         |
| 34T <sub>3</sub>   | R               | R   | R   | S   | R   | R   | R          | R  | R  | S         | S         |
| 36T <sub>3</sub>   | S               | S   | S   | S   | R   | R   | S          | S  | S  | S         | S         |
| 31MI <sub>2</sub>  | S               | S   | S   | S   | R   | R   | S          | S  | S  | S         | S         |
| 32MIE <sub>1</sub> | S               | S   | S   | S   | R   | R   | S          | S  | S  | S         | S         |

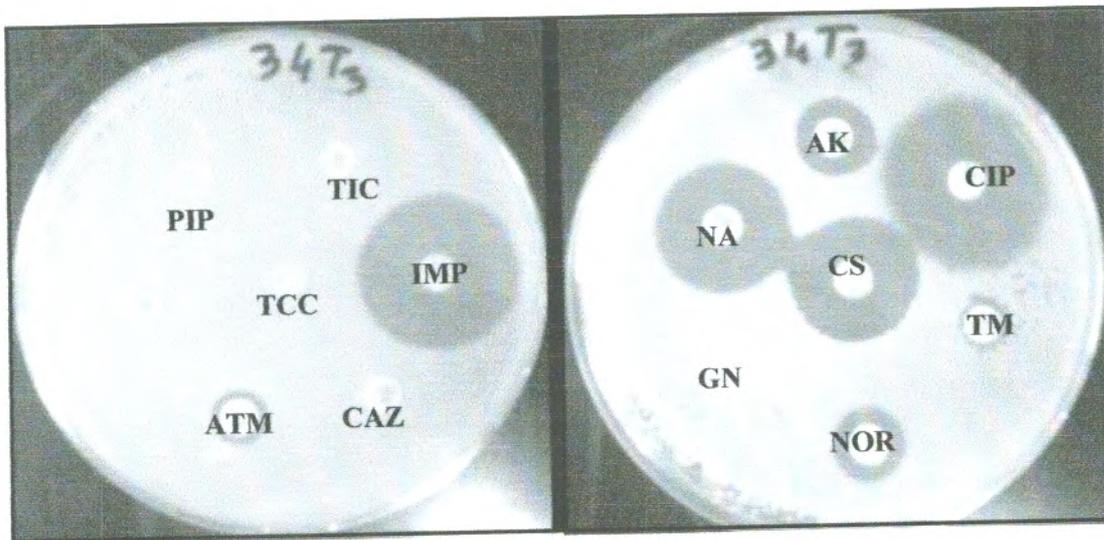
Annexe 6. Résultats des CMI des souches d'*Acinetobacter baumannii*

| Souches          | CAZ  |    | AMK  |     | CIP |    |
|------------------|------|----|------|-----|-----|----|
|                  | ≤4   | >8 | ≤8   | >16 | ≤1  | >1 |
| 2T               | 128  |    | <1   |     | 32  |    |
| 16T <sub>1</sub> | >512 |    | 256  |     | 2   |    |
| 22T <sub>2</sub> | 64   |    | 64   |     | 64  |    |
| 23T <sub>2</sub> | 32   |    | 256  |     | 1   |    |
| 24T <sub>1</sub> | 32   |    | 256  |     | 0,5 |    |
| 24T <sub>2</sub> | 64   |    | >512 |     | 64  |    |
| 34T <sub>3</sub> | 32   |    | 256  |     | 0,5 |    |

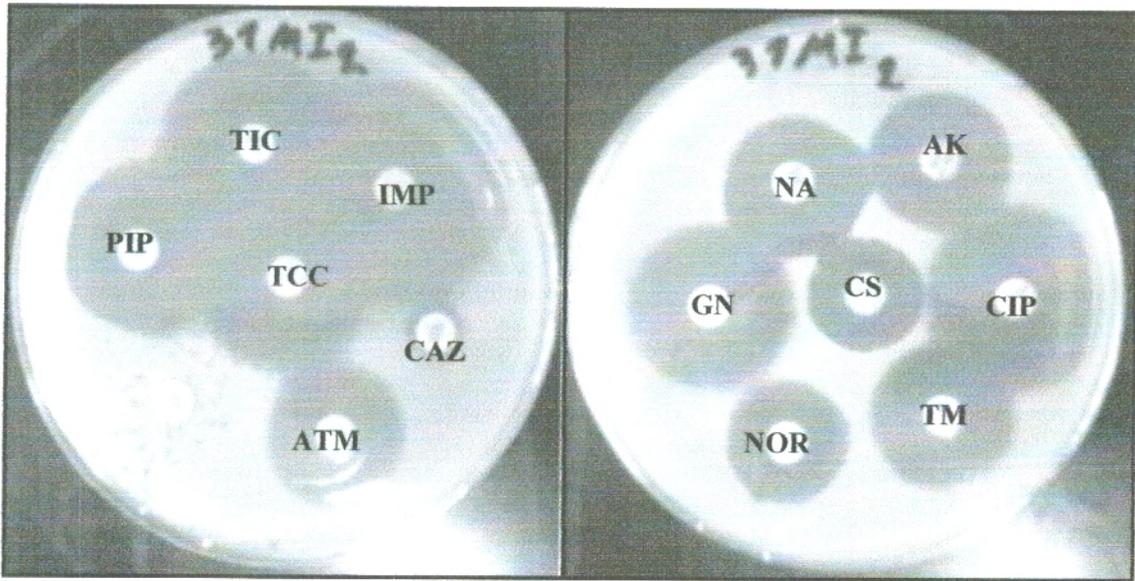
Annexe 7. Photos d'antibiogrammes des souches d'*Acinetobacter baumannii*



Souche multirésistante



Souche multirésistante excepté à l'imipénème



**Souche sensible**

## الملخص

*Acinetobacter baumannii* هي واحدة من أكثر أنواع البكتيريا المشاركة في عدوى المستشفيات وأنها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية ويرجع ذلك إلى مزيج من عدة آليات المقاومة. من مجموع 11 سلالة معزولة، أظهرت 100% من هذه البكتيريا مقاومة لل سيفتازيديم مع ارتفاع لنسبة التركيز التثبيط الصغرى بمستوى يعادل 512 ميكروغرام في المليلتر و 18,18 للإميبينيم. الكوليستين هو المضاد الحيوي الأكثر نشاطا، إذ أن 100% من هذه البكتيريا أظهرت حساسية اتجاهه. وكشف تحليل PCR الوراثة للجينات المتسببة لهذه المقاومة لعدم وجود carbapenemase من نوع NDM في هذه السلالات.

الكلمات المفتاحية : العدوى – *Acinetobacter baumannii* – المضادات الحيوية – المقاومة

## Résumé

*Acinetobacter baumannii* est une des espèces les plus impliqués dans les infections nosocomiales et elle est résistante à de nombreuses familles d'antibiotiques du fait de l'association de plusieurs mécanismes de résistance. Sur un total de 11 souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées, 100% ont présenté une résistance au ceftazidime avec une CMI supérieur à 512µg/ml et 18,18% à l'imipénème. La colistine est l'antibiotique le plus actif avec 100% de souches sensibles. L'analyse génotypique par PCR des gènes codant pour cette résistance a révélé l'absence d'une carbapénémase de type NDM chez ces souches.

**Mots clés :** Infections nosocomiales – *Acinetobacter baumannii* – Antibiotiques – Résistance

## Summary

*Acinetobacter baumannii* is one of the most involved in nosocomial infections species and it is resistant to many classes of antibiotics due to the combination of several mechanisms of resistance. Of a total of 11 strains of *Acinetobacter baumannii* isolated, 100% showed resistance to ceftazidime with a higher MIC 512µg/ml and 18.18% to imipenem. Colistin is the most active antibiotic with 100% of susceptible strains. Genotypic PCR analysis of the genes coding for this resistance revealed the absence of a carbapenemase NDM-type in these strains.

**Key words :** Nosocomials infections – *Acinetobacter baumannii* – Antibiotics – Resistance