



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques »

THESE DE DOCTORAT

THEME

Etude de la résistance aux antibiotiques
de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents
hôpitaux de l'ouest algérien

Présentée et soutenue le 29 Janvier 2015 à Tlemcen, Algérie

Par

M^{me} SEFRAOUI Imane Ep KHELIL

Composition du jury :

Pr ABDELOUAHID D.E	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Président du jury
Pr DRISSI M	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Directeur de Thèse
Pr TOUATI A	Université Abderrahmane Mira- Bejaia	Examineur
Pr CHERIGUENE A.E	Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem	Examineur
Pr KARAM N.E	Université d'Oran-Sénia	Examineur
Pr HASSAINE H	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Examinatrice

Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien

ملخص

عصيات *Pseudomonas aeruginosa* هي جراثيم ممرضة انتهازية مسؤولة أساسا عن الالتهابات المكتسبة وتُظهر هذه البكتيريا قدرة التكيف تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان. مجموع 217 جرثوم من عصيات *P. aeruginosa* تم عزلها ما بين يناير 2009 ونوفمبر 2012، في مختلف الوحدات من ثلاثة مستشفيات جامعية في الغرب الجزائري. دراسة حساسية هذه الجراثيم إلى 12 مضاد حيوي منهم 7 β -لكتامين، 3 أمينوزيد، 1 فلبيوروكينولون والكولستين، تبين ظهور جراثيم متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. 39 (18%) كانت مقاومة للإيميبينام ($MICs \geq 16 \mu g/ml$) تم الكشف عن الجين bla_{VIM-2} تشفير ميتالو- β -لاكتاماز في سلالتين. أظهرت السلالات المقاومة للإيميبينام وجود طفرات في الجين *oprD*. تحليل السلالات بواسطة ال-MLST، أظهر وجود العديد من المستقرات الطبيعية الإستتساخية. أيضا، غالبية السلالات المقاومة تنتمي إلى ST244 نسخة دولية خطيرة. أظهرت السلالات التي تنتمي إلى نفس النسخة الوبائية وجود سلسلة الجين *oprD* متطابقة. هذه الدراسة تمثل الكشف الثاني للميتالو- β -لاكتاماز VIM-2 في عام 2010 في سلالات *P. aeruginosa* في الجزائر. وجدنا أيضا أن الطفرات في الجين *oprD* هي الآلية الرئيسية لمقاومة الإيميبينام. أظهرنا أن الطفرات في الجين *oprD* يمكن أن تستخدم كأداة لدراسة الطبيعية الإستتساخية و قابلية التنسيل بين سلالات *P. aeruginosa*

الكلمات المفتاحية:

Pseudomonas aeruginosa، مقاومة المضادات الحيوية، علم الأوبئة، الدراسة الجينية.

RESUME

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infections nosocomiales. Cette espèce manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Un ensemble de 217 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées, entre janvier 2009 et novembre 2012, au niveau de divers services de trois centres hospitalo-universitaires du nord-ouest algérien. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes vis-à-vis de 12 antibiotiques dont 7 β -lactamines, 3 aminosides, une fluoroquinolone et la colistine, par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM, a révélé l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. 39 (18%) étaient résistantes à l'imipénème ($CMI \geq 16 \mu g / ml$). Le gène bla_{VIM-2} codant une métallo- β -lactamase a été détecté chez deux souches. Les souches résistantes à l'imipénème ont montré la présence de mutations sur le gène *oprD*. L'analyse des souches par MLST a montré la présence de divers clones. De même, la majorité des souches résistantes appartenait au ST244, clone international à haut risque. Les souches appartenant au même clone épidémique présentaient une séquence du gène *oprD* identique. Nous rapportons la deuxième détection en 2010 de métallo- β -lactamase VIM-2 chez les souches de *P. aeruginosa* en Algérie. Nous avons également constaté que les mutations *oprD* étaient le principal mécanisme de la résistance à l'imipénème. Nous démontrons que ces mutations *oprD* peuvent être utilisées comme un outil pour étudier la clonalité chez les souches de *P. aeruginosa*.

MOTS CLES :

Pseudomonas aeruginosa; résistance aux antibiotiques ; épidémiologie ; étude génotypique.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen mainly responsible for nosocomial infections. These bacteria exhibit a big power of adapting for the antibiotics resulting in therapeutic problems often acute. A total of 217 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated between January 2009 and November 2012 from various units of three hospitals from western Algeria. The study *in vitro* of susceptibility of these organisms to 12 antibiotics, including 7 β -lactams, three aminoglycosides, one fluoroquinolone and colistin, revealed the emergence of antibiotics multiresistant strains. 39 (18%) were found to be resistant to imipenem ($MICs \geq 16 \mu g / ml$). The bla_{VIM-2} gene was detected in two strains. The remaining imipenem-resistant isolates showed the presence of *oprD* mutations. The MLST analysis differentiated strains into various clones and the strains from the same clone had an identical sequence of the *oprD* gene. The majority of resistant strains belonged to ST244 international high-risk clone. We report the second detection in 2010 of bla_{VIM-2} in Algerian *P. aeruginosa* strains. We also found that *oprD* mutations were the major determinant of high-level imipenem resistance. We demonstrate that these *oprD* mutations can be used as a tool to study the clonality in *P. aeruginosa* isolates.

KEY WORDS:

Pseudomonas aeruginosa; antibiotics resistance; epidemiology; genotyping



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques »

THESE DE DOCTORAT

THEME

Etude de la résistance aux antibiotiques
de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents
hôpitaux de l'ouest algérien

Présentée et soutenue le 29 Janvier 2015 à Tlemcen, Algérie

Par

M^{me} SEFRAOUI Imane Ep KHELIL

Composition du jury :

Pr ABDELOUAHID D.E	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Président du jury
Pr DRISSI M	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Directeur de Thèse
Pr TOUATI A	Université Abderrahmane Mira- Bejaia	Examineur
Pr CHERIGUENE A.E	Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem	Examineur
Pr KARAM N.E	Université d'Oran-Sénia	Examineur
Pr HASSAINE H	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire « **Antibiotiques, Antifongiques: physico- chimie, Synthèse et Activité Biologique** » (LAPSAB), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, ainsi que « **l'Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes** » (URMITE), UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Aix-Marseille, France.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon Directeur de thèse **M^r Mourad DRISSI**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, qui m'a guidé et orienté tout au long de cette thèse et pour l'ensemble du savoir pratique et théorique qu'il m'a transmis. Sa patience, sa disponibilité, sa gentillesse inestimable, ses qualités humaines, sa confiance, et la qualité de son encadrement scientifique ont permis que cette thèse se passe dans de bonnes conditions.

Je tiens à remercier le Professeur **Jean Marc ROLAIN** (Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Université Aix-Marseille, France) qui m'a accueilli dans son laboratoire et a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour l'accomplissement de cette thèse, je le remercie pour sa disponibilité sans limite et pour tous ses conseils.

Je tiens à remercier également toute l'équipe de son laboratoire pour leur gentillesse leurs conseils, leur soutien et les moments que nous avons partagés.

Je remercie également

M^r ABDELOUAHID D.E, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, **M^r TOUATI A**, Professeur à l'Université Abderrahmane Mira- Bejaia, **M^r CHERIGUENE A.E**, Professeur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem, **M^r KARAM N.E**, Professeur à l'Université d'Oran-Sénia et **M^{me} HASSAINE H**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au

Docteur BATSSI AMIR S du CHU de Sidi Bel Abbes, **Docteur BENHADOUCHE R** du CHU de Tlemcen ainsi qu'au **Docteur BEKHOUCHA**, qui nous ont chaleureusement accueilli au sein de leur services et qui nous ont fourni toute l'aide et les facilités nécessaires pour effectuer des prélèvements dans les meilleures conditions.

Les dynamiques équipes d'infirmiers des services de réanimation des trois CHU pour leur aide et leur soutien.

Mes Vifs remerciements s'adressent à ma chère amie **Meryem BERREZZEG** pour sa gentillesse, sa générosité, son aide et son soutien tout au long de ce travail et les moments que nous avons partagés.

Je remercie aussi toutes mes collègues et amies de paillasse ainsi que l'ensemble des techniciens et membres du laboratoire **LAPSAB** pour leur disponibilité et sympathie.

Je tiens à remercier **Ma** petite sœur Nihel, **Mes** frères Mohammed Hadi et Salah Eddine, pour leur amour, leurs encouragements, leur conseils et soutien morale.

Et surtout, je voudrais adresser plus qu'un grand merci à mes **Parents** et mon **Epoux** qui ont toujours été là pour moi et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Il est difficile d'exprimer tout ce que je leur dois. Cette thèse est aussi la leur.

*La science n'a pas de patrie,
parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité,
le flambeau qui éclaire le monde.*

Louis Pasteur (1822-1895)

TABLE DES MATIERES

RESUME	i
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2 Résistance aux β -lactamines	5
1.2.1 Résistance enzymatique	5
1.2.2 Résistance non enzymatique.....	16
1.3 Résistance aux aminosides	18
1.4 Résistance aux fluoroquinolones	20
1.5 Résistance à la colistine	21
1.6 Résistance par formation de biofilm.....	22
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	24
2.1 Souches bactériennes étudiées	24
2.2 Identification des souches	24
2.2.1 Galerie API 20NE.....	24
2.2.2 MALDI-TOF	24
2.3 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	26
2.4 Test à l'EDTA	27
2.5 Détection de MBL par bandelette E-test	28
2.6 Identification des gènes de résistance par PCR simple.....	28
2.6.1 Extraction de l'ADN bactérien	31
2.6.2 Préparation du mix	31
2.6.3 Programmation du thermocycleur	31
2.6.4 Lecture des résultats de PCRs.....	32
2.6.5 Purification des produits de PCR	33

2.6.6	Séquençage	33
2.7	Multi-locus sequence typing (MLST)	35
2.7.1	Extraction de l'ADN.....	35
2.7.2	Amplification des 7 gènes.....	366
2.7.3	Contrôle des produits amplifiés	36
2.7.4	Séquençage	377
2.7.5	Analyse des séquences obtenues	37
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION		38
3.1	Répartition des souches identifiées	38
3.2	Sensibilité aux antibiotiques	39
3.3	Phénotypes de résistance aux antibiotiques	42
3.4	Identification des gènes de résistance aux antibiotiques.....	45
3.4.1	Résistance enzymatique	45
3.4.2	Résistance non enzymatique.....	47
3.5	Typage moléculaire	50
3.6	Discussion	53
CONCLUSION		59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		62

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 β -lactamases de Classe A et D rapportées chez <i>P. aeruginosa</i> dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013)	11
Figure 1.2 MBLs de type VIM rapportées chez <i>P. aeruginosa</i> dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013)	15
Figure 3.3 Antibiogrammes de deux souches de <i>P. aeruginosa</i> multiresistantes aux antibiotiques isolées au CHU d'Oran.	40
Figure 3.4 E-test : résultat positif pour l'EDTA	42
Figure 3.5 Répartition des phénotypes de résistance selon les hôpitaux.	44
Figure 3.6 Résultats de la PCR <i>bla</i> _{TEM}	45
Figure 3.7 Résultats de la PCR <i>bla</i> _{VIM}	46
Figure 3.8 Résultats de la PCR <i>aac</i> (3')-II.....	46
Figure 3.9 Résultats de la PCR <i>aad</i> -A.....	47
Figure 3.10 Résultats de la PCR <i>oprD</i>	47
Figure 3.11 Comparaison de la séquence <i>oprD</i> de la souche OP107 avec PAO1.....	48
Figure 3.12 Traduction de la séquence <i>oprD</i> des souches OP107 et PAO1 en protéines	49
Figure 3.13 Résultats de la PCR MLST	50
Figure 3.14 Arbre phylogénétique basé sur les séquences MLST de 53 souches de <i>P. aeruginosa</i> alignée avec la souche PAO1	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Score d'identification des bactéries	26
Tableau 2.2 Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR.....	30
Tableau 2.3 Produits du mix PCR	31
Tableau 2.4 Produits du mix séquençage	34
Tableau 2.5 Programme du thermocycleur	34
Tableau 2.6 Amorces de séquençage pour le typage par MLST de <i>P. aeruginosa</i>	36
Tableau 3.7 Origine et répartition des souches selon les services	38
Tableau 3.8 Origine et répartition des souches selon les sites de prélèvement	39
Tableau 3.9 Taux de résistance aux antibiotiques	41
Tableau 3.10 Répartition des phénotypes de résistance selon les services	43
Tableau 3.11 Répartition des différents Groupes OprD au sein des trois hôpitaux ...	49

RESUME

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infections nosocomiales. Cette espèce manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Un ensemble de 217 souches de *P. aeruginosa* a été isolé, entre janvier 2009 et novembre 2012, au niveau de divers services de trois centres hospitalo-universitaires du nord-ouest algérien. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes vis-à-vis de 12 antibiotiques dont 7 β -lactamines, 3 aminosides, une fluoroquinolone et la colistine, par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM, a révélé l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. 39 (18%) étaient résistantes à l'imipénème (CMI \geq 16 μ g / ml). Le gène *bla*_{VIM-2} codant une métallo- β -lactamase a été détecté chez deux souches. Les souches résistantes à l'imipénème ont montré la présence de mutations sur le gène *oprD*. L'analyse des souches par MLST a montré la présence de divers clones. De même, la majorité des souches multirésistantes appartenait au ST244, clone international à haut risque. Les souches appartenant au même clone épidémique présentaient une séquence du gène *oprD* identique. Nous rapportons la deuxième détection en 2010 de métallo- β -lactamase VIM-2 chez les souches de *P. aeruginosa* en Algérie. Nous avons également constaté que les mutations *oprD* étaient le principal mécanisme de la résistance à l'imipénème. Nous démontrons que ces mutations *oprD* peuvent être utilisées comme un outil pour étudier la clonalité chez les souches de *P. aeruginosa*.

MOTS CLES :

Pseudomonas aeruginosa; résistance aux antibiotiques ; épidémiologie ; étude génotypique.

ملخص

عصيات *Pseudomonas aeruginosa* هي جراثيم ممرضة انتهازية مسؤولة أساسا عن الالتهابات المكتسبة وتُظهر هذه البكتيريا قدرة التكيف تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان. مجموع 217 جرثوم من عصيات *P. aeruginosa* تم عزلها ما بين يناير 2009 ونوفمبر 2012، في مختلف الوحدات من ثلاثة مستشفيات جامعية في الغرب الجزائري. دراسة حساسية هذه الجراثيم إلى 12 مضاد حيوي منهم 7 β -لاكتامين، 3 أمينوزيد، 1 فليوروكينولون والكولستين، تبين ظهور جراثيم متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. 39 (18%) كانت مقاومة للايميبينام ($MICs \geq 16 \mu g/ml$). تم الكشف عن الجين-*bla*_{VIM} 2 تشفير ميتالو- β -لاكتاماز في سلالتين. أظهرت السلالات المقاومة للايميبينام وجود طفرات في الجين *oprD* تحليل السلالات بواسطة ال-MLST، اظهر وجود العديد من المستقرات الطبيعية الإستنساخية. ايضا، غالبية السلالات المقاومة تنتمي إلى ST244، نسخة دولية خطيرة. اظهرت السلالات التي تنتمي إلى نفس النسخة الوبائية وجود سلسلة الجين *oprD* متطابقة. هذه الدراسة تمثل الكشف الثاني للميتالو- β -لاكتاماز VIM-2 في عام 2010 في سلالات *P. aeruginosa* في الجزائر. وجدنا أيضا أن الطفرات في الجين *oprD* هي الآلية الرئيسية لمقاومة الإيميبينام. اظهرنا أن الطفرات في الجين *oprD* يمكن أن تستخدم كأداة لدراسة الطبيعية الإستنساخية و قابلية التنسيل بين سلالات *P. aeruginosa*.

الكلمات المفتاحية:

Pseudomonas aeruginosa ، مقاومة المضادات الحيوية، علم الأوبئة، الدراسة الجينية.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen mainly responsible for nosocomial infections. These bacteria exhibit a big power of adapting for the antibiotics resulting in therapeutic problems often acute. A total of 217 strains of *P. aeruginosa* were isolated between January 2009 and November 2012 from various units of three hospitals from western Algeria. The study *in vitro* of susceptibility of these organisms to 12 antibiotics, including 7 β -lactams, three aminoglycosides, one fluoroquinolone and colistin, revealed the emergence of antibiotics multiresistant strains. 39 (18%) were found to be resistant to imipenem (MICs ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$). The *bla*_{VIM-2} gene was detected in two strains. The remaining imipenem-resistant isolates showed the presence of *oprD* mutations. The MLST analysis differentiated strains into various clones and the strains from the same clone had an identical sequence of the *oprD* gene. The majority of resistant strains belonged to ST244, international high-risk clone. We report the second detection in 2010 of *bla*_{VIM-2} in Algerian *P. aeruginosa* strains. We also found that *oprD* mutations were the major determinant of high-level imipenem resistance. We demonstrate that these *oprD* mutations can be used as a tool to study the clonality in *P. aeruginosa* isolates.

KEY WORDS:

Pseudomonas aeruginosa; antibiotics resistance; epidemiology; genotyping.

INTRODUCTION

La découverte et l'utilisation clinique de la pénicilline au début des années 40, nous a longtemps permis de considérer les antibiotiques comme étant les armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Toutefois, La résistance aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses, le rendant ainsi difficile et parfois impossible. Ainsi, des échecs thérapeutiques surviennent déjà pour des infections pourtant banales, mais causées par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) et vont se multiplier, avec un risque de décès. Cette résistance pourrait être due à l'utilisation massive et systématique des antibiotiques, que ce soit dans le domaine médical ou agroalimentaire. Elle est devenue une menace à l'échelle planétaire, prise très au sérieux par les autorités sanitaires qui, comme l'OMS (organisation mondiale de la santé), commencent à multiplier les mises en gardes et les plans d'action.

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Méditerranée, avec 25 pays, convergeant sur trois continents et un flux de population important migratoire et touristique, représente un problème majeur de santé publique, notamment dans les pays en voie de développement. Par conséquent, le défi auquel nous sommes confrontés aujourd'hui est de ralentir l'apparition de la résistance à travers l'optimisation de la thérapie avec des médicaments actuellement disponibles.

Au cours de la dernière décennie, les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* ont été rapportées partout dans le monde, avec une émergence rapide et croissante de souches multirésistantes, la plupart du temps dans des unités de soins intensifs (Gaynes et Edwards, 2005). Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010 attribue à *P. aeruginosa* la responsabilité de 9,2 % de l'ensemble des infections nosocomiales, le plaçant ainsi au 3ème rang des espèces isolées juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Amazian *et al.*, 2010).

P. aeruginosa présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre restreint. Les résistances acquises pour ces antibiotiques sont cependant très fréquentes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance liés à des mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes exogènes. Ce pathogène opportuniste est caractérisé par sa capacité à persister et à résister au niveau de l'environnement hospitalier, ou se trouvent réunies toutes les conditions favorables à son émergence et dissémination, et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques, aboutissant rapidement à une impasse thérapeutique, expliquant ainsi les taux de résistance constatés dans de nombreux pays du bassin méditerranéen, notamment dans les pays de l'Afrique du nord.

La surveillance épidémiologique des résistances aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif, dont les souches de *P. aeruginosa*, montre ces dix dernières années en Algérie l'émergence de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (Drissi *et al.*, 2008; Aggoune-Khinache *et al.*, 2009; Drissi *et al.*, 2010; Bakour *et al.*, 2012; Baba Ahmed-Kazi *et al.*, 2013; Touati *et al.*, 2013; Berrazeg *et al.*, 2013; Mesli *et al.*, 2013). Ceci reflète la problématique des souches multirésistantes, présentant des résistances associées à au moins 3 classes d'antibiotiques, pour lesquelles la colistine reste souvent la seule molécule active, compliquant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients. Ainsi, l'émergence progressive de souches multirésistantes produisant des β -lactamases à spectre étendu (BLSEs), des oxacillinases à large spectre (ES-OXA) ou des métallo-carbapénèmases (MBLs) à l'origine de petits foyers épidémiques, doit entraîner une vigilance extrême de la part des cliniciens afin de pouvoir stopper la dissémination de ces souches. De même, l'acquisition des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne.

C'est dans ce cadre d'idées que ce projet de thèse s'inscrit avec comme principaux objectifs, l'étude de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'épidémiologie moléculaire des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir de trois des plus importants centres hospitalo-universitaires (CHU) du nord-ouest algérien, incluant le CHU de Tlemcen, le CHU de Sidi Bel Abbes ainsi que le CHU d'Oran, ce dernier (CHU d'Oran) faisant partie du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques.

Le premier chapitre présente l'agent pathogène *Pseudomonas aeruginosa* en élucidant ses mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement des infections causées par ce germe, incluant, les β -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones ainsi que la colistine. Aussi, une mise au point est faite sur l'épidémiologie des gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés dans les pays méditerranéens, notamment ceux retrouvés dans les pays de l'Afrique du nord. Le deuxième chapitre présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* a reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat). Le chirurgien Charles-Emmanuel Sedillot en 1850 fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (Lister *et al.*, 2009). C'est en 1869 que Fordos a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (Williams et Cameron, 1894). *P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois treize ans plus tard en 1882 par Gessard qui a démontré que ce pigment a été le produit d'un organisme, *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) (Gessard, 1984).

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. *P. aeruginosa* est une bactérie dépourvue de spores et de capsules, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire (Hafiane et Ravaoarino, 2008). C'est une bactérie mésophile capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C avec une température optimale de croissance entre 30 et 37°C. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, mais en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Van Alst *et al.*, 2009).

Le génome de *P. aeruginosa* a été séquencé en 2000 chez la souche de référence PAO1 (Stover *et al.*, 2000). C'est l'un des plus grands génomes bactériens séquencés, avec 6,3 millions de paires de bases (Stover *et al.*, 2000). Ce génome donne un aperçu sur sa grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique ainsi que la résistance intrinsèque aux antibiotiques (Stover *et al.*, 2000).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement (sols, eaux...) (Lister *et al.*, 2009) sous forme planctonique, ou à l'état sessile dans un biofilm (Costerton *et al.*, 1995). La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, hautement induits dans l'infection et s'expriment préférentiellement sur les terrains immunodéprimés (Mahenthalingam *et al.*, 1996).

En 1996, Galtier a rapporté dans son ouvrage « La Stérilisation » que c'est lorsque le malade est à l'hôpital qu'il court le plus de risques d'infection, dont la conséquence sera l'altération de sa santé. Il a mentionné que la cause en est la surinfection intra-hospitalière, appelée « nosocomiale », en référence à un mot d'origine grecque, utilisé pour la première fois au *Ile*

siècle ap. J.-C. par Arrien de Nicomédie, disciple d'Epictète avec le sens : soin du malade. Le risque de survenue de ces surinfections étant particulièrement élevé dans les services de soins intensifs, de grands brûlés, de polytraumatisés et chez les patients atteints de déficits immunitaires.

P. aeruginosa est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiales. Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, le classe comme étant le troisième principal agent des infections nosocomiales, juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Amazian *et al.*, 2010). Il est naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, aux céphalosporines de première et deuxième génération, à la plupart des céphalosporines de troisième génération, aux quinolones de première génération et à la kanamycine, et est caractérisé par son aptitude particulière à acquérir et cumuler de nombreux mécanismes de résistance pendant le traitement d'une infection. En outre, il a toujours été considéré comme un microorganisme difficile à traiter (Mesaros *et al.*, 2007). Malheureusement, la perspective d'avoir de nouveaux agents antipseudomonas à l'utilisation clinique dans un avenir proche n'est pas prometteur (Lister *et al.*, 2009).

P. aeruginosa est un commensal du tube digestif, peu abondant chez l'homme en bonne santé (2 à 10 % de porteurs), mais la proportion de porteurs asymptomatiques chez les patients hospitalisés (essentiellement des personnes immunodéprimées) peut atteindre 50% sur certains sites et 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres (Minchella *et al.*, 2010). Ainsi, la principale source de contamination des patients hospitalisés est donc leur flore endogène mais l'environnement est également incriminé (Talon *et al.*, 1995; Bergmans *et al.*, 1998; Minchella *et al.*, 2010). La transmission croisée est le plus souvent manuportée par le personnel soignant, soit directement de patient à patient, soit indirectement à partir de surfaces inertes préalablement contaminées. Dans les services de soins intensifs, *P. aeruginosa* évolue par bouffées épidémiques sur un fond endémique (Talon *et al.*, 1995; Bergmans *et al.*, 1998; Lister *et al.*, 2009).

1.2 Résistance aux β -lactamines

1.2.1 Résistance enzymatique

Depuis l'introduction de la pénicilline G en thérapeutique durant la seconde guerre mondiale, un grand nombre de β -lactamines a été mis sur le marché. Les β -lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes constituent la

famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée dans le traitement des infections à bactéries à Gram négatif, notamment *P. aeruginosa*. Les bactéries se sont progressivement adaptées à ces antibiotiques par différents mécanismes de résistance, le plus souvent, par production d'enzymes β -lactamases, qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame de ces antibiotiques (Philippon *et al.*, 1998), l'expulsion de ces antibiotiques par la surproduction d'un système d'efflux actif (Masuda *et al.*, 2000) ou l'imperméabilité de la membrane causée par un déficit en porine OprD (Li *et al.*, 2012).

En fonction de leur structure primaire, les β -lactamases ont été regroupées en quatre classes de A à D selon la classification d'Ambler (Ambler, 1980). Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active, seule la classe B regroupant les métallo- β -lactamases (MBLs), nécessitent les ions Zn^{++} pour leur activité et sont inhibées par les chélateurs d'ions comme l'EDTA et non par les inhibiteurs classiques de β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010). L'enzyme AmpC, les BLSEs (β -lactamases à spectre étendu) et les MBLs (métallo- β -lactamases) ont un impact thérapeutique majeur chez *Pseudomonas aeruginosa* (Merens, 2011).

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C dans la classification d'Ambler (Ambler, 1980). *P. aeruginosa* produit une céphalosporinase chromosomique naturelle, dite AmpC qui est faiblement exprimée chez les bactéries sauvages. L'expression du gène *ampC* étant inductible, l'enzyme inactive la plupart des pénicillines et des céphalosporines. Cependant, diverses mutations peuvent entraîner la dérégulation permanente et stable du gène *ampC*. Ces mutations peuvent toucher le gène *ampC* lui-même ou les gènes qui rentrent dans sa régulation (Nordmann, 2003) en induisant une résistance à toutes les β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes. Les céphalosporines de 4^e génération (céfépime, cefpirome), bien que théoriquement plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse par céphalosporinases, sont rarement efficaces sur des souches surexprimant le gène *ampC*, car l'association d'un certain niveau de résistance naturelle au céfépime/cefpirome associée à l'hyper-expression de AmpC compromet totalement l'efficacité de ces molécules (Livermore, 2002; Rossolini et Mantengoli, 2005). Contrairement aux entérobactéries, le gène codant AmpC chez *P. aeruginosa* n'a jamais été identifié sur des plasmides. Actuellement, la surproduction de céphalosporinases constitue le mécanisme de résistance à la ceftazidime le plus fréquemment retrouvé chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées dans divers pays de la

Méditerranée (Garcia-Rodriguez et Jones, 2002; Kalai *et al.*, 2004; Dubois *et al.*, 2008; Drissi *et al.*, 2008; El-Mahdy, 2013).

Les β -lactamases acquises retrouvées chez *P. aeruginosa* peuvent être classés en trois différents groupes: i) des enzymes à spectre étroit (par exemple, PSE-1/4) qui dégradent efficacement les pénicillines et les céfopérazones, ii) les β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) qui dégradent également les céphèmes et monobactames; iii) les métallo- β -lactamases (MBLs) qui dégradent toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam (Endimiani *et al.*, 2006). Dans la dernière décennie, un grand nombre de β -lactamases de classes A, B et D ont été détectées chez les souches de *P. aeruginosa* (Zhao et Hu, 2010).

Parmi les β -lactamases de classes A, les pénicillinases, dont les enzymes PSE (*Pseudomonas* Specific Enzyme) confèrent une résistance aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines, mais pas à la ceftazidime et carbapénèmes (Bert *et al.*, 2002). Quatre enzymes PSE ont été rapportées chez *P. aeruginosa*: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 et CARB-4 (Bert *et al.*, 2002).

Ces enzymes sont étroitement liées, et ne diffèrent que par seulement 1 ou 2 acides aminés mis à part CARB-4, avec laquelle ils ne présentent que 86,3% d'homologie (Strateva et Yordanov, 2009). La première PSE-1 en Afrique du nord a été rapportée en Tunisie par Ktari et ses collaborateurs (Ktari *et al.*, 2011).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) appartiennent aux classes A ou D d'Ambler. Elles sont spécifiquement définies comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les carboxypenicillines et les uréidopénicillines, mais aussi les céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime, céfépime, cefpirome) et l'aztréonam et sont inhibées par l'inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique (Weldhagen *et al.*, 2003).

Les BLSEs de la classe A d'Ambler ont été largement rapportées chez les entérobactéries depuis 1980, alors qu'elles n'ont été décrites que plus récemment chez *P. aeruginosa* (Weldhagen *et al.*, 2003). Les gènes codant ces enzymes sont situés sur le chromosome bactérien ou sur des éléments mobiles, expliquant la rapidité de leur diffusion (Weldhagen *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* peut acquérir une β -lactamase à spectre étendu de classe A à partir d'un transfert d'ADN d'une autre espèce (Nordmann et Naas, 1994). Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSEs étaient dérivées de TEM et SHV apparues chez *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Sirot *et al.*, 1987; Bure *et al.*, 1988). Les nombreuses

mutations qui ont eu lieu ont conduit à une grande diversité de TEM (> 130) et SHV (>50) (De Champs *et al.*, 2004).

L'enzyme SHV-2a a été détectée la première fois chez *P. aeruginosa* en 1995 en France chez un patient de retour de la Tunisie (Naas *et al.*, 1999a). Par la suite, la BLSE de type SHV-5 a été identifiée dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Grèce (Neonakis *et al.*, 2003;Poirel *et al.*, 2004). Le gène *bla_{SHV-5}* était chromosomique et pouvait avoir résulté du transfert d'un plasmide porteur du gène *bla_{SHV-5}* à partir d'entérobactéries suivi de son intégration chromosomique (Legakis *et al.*, 1995;Poirel *et al.*, 2004). Cette enzyme, SHV-5, détermine un haut niveau de résistance à la ceftazidime et aux monobactames (Strateva et Yordanov, 2009). Dans le nord de l'Afrique, la BLSE SHV-2a, à médiation chromosomique, a été rapportée chez sept souches de *P. aeruginosa* en Tunisie (Mansour *et al.*, 2009a). Plus récemment, 24 souches productrices de SHV-2a et une souche productrice de l'enzyme SHV-12, une variante de SHV-2a, ont été isolées au niveau de 13 hôpitaux géographiquement éloignés en France (Amiens, Auxerre, Béthune, Clamart, Lille, 2 hôpitaux de Marseille, 2 à Paris, Montereau-Fault-Yonne, Neuilly-sur-Seine, Reims, et Versailles) (Jeannot *et al.*, 2013).

Entre 1992 et 1998, plusieurs souches de *P. aeruginosa* productrices de TEM ont été isolées en France : TEM-42, TEM-4, TEM-21 et TEM-24 (Mugnier *et al.*, 1996;Poirel *et al.*, 1999;Marchandin *et al.*, 2000;Dubois *et al.*, 2002a). Ces BLSEs ont un spectre d'activité équivalent à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (C3G et aztréonam).

En plus des BLSEs de type TEM et SHV qui sont largement décrites chez les entérobactéries, d'autres BLSEs ont été identifiées chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes sont de plus en plus isolées dans les pays méditerranéens (Fig.1.1).

En 1993, l'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance), à médiation chromosomique, a été détectée pour la première fois chez *P. aeruginosa* en France dans un isolat urinaire d'un patient turque (Nordmann *et al.*, 1993). Par la suite, un plasmide codant cette enzyme a été décrit (Danel *et al.*, 1995a). Une étude multicentrique menée en Turquie en 1996 a révélé une prévalence élevée de cette enzyme chez les isolats cliniques d'*Acinetobacter* spp et *P. aeruginosa* (Vahaboglu *et al.*, 1997). Actuellement, il y a une large diffusion de *bla_{PER-1}* dans les isolats nosocomiaux de *P. aeruginosa* en Turquie (Vahaboglu *et al.*, 2001;Kolayli *et al.*, 2005). Des souches productrices de PER-1 ont été impliquées dans des épidémies hospitalières dans plusieurs études menées en France (De Champs *et al.*,

2004; Llanes *et al.*, 2006; Hocquet *et al.*, 2010). Cette BLSE a été rapportée en Italie, entre 1997 et 1998 (Luzzaro *et al.*, 2001), et plus récemment en Grèce (Ranellou *et al.*, 2012). La seule description de PER-1 en Afrique du nord a été rapportée en Tunisie (Ktari *et al.*, 2011) (Fig.1.1).

Une autre BLSE ne dérivant pas des types TEM et SHV, l'enzyme VEB (Vietnamese Extended spectrum β -lactamase). VEB-1 a été détectée la première fois chez *P. aeruginosa* en 1998 en France (Naas *et al.*, 1999b) et plus récemment chez une seule souche (Hocquet *et al.*, 2010). Cette enzyme a été rapportée comme étant épidémique en Bulgarie (Strateva *et al.*, 2007; Vatcheva-Dobrevska *et al.*, 2013). *bla*_{VEB-1} fait souvent partie d'un gène cassette situé sur un intégron de classe 1 (Poirel *et al.*, 2003; Aubert *et al.*, 2012).

A la fin du 20^e siècle, une nouvelle BLSE a été décrite, GES (Guiana Extended Spectrum). GES-1 a été rapportée depuis la France (Dubois *et al.*, 2002b), le Brésil (Castanheira *et al.*, 2004) et l'Espagne (Viedma *et al.*, 2009).

GES-2 dérive de la BLSE GES-1 par mutation ponctuelle. Cette BLSE codée par un plasmide conjugatif a été rapportée en Afrique du Sud (Poirel *et al.*, 2001b; Poirel *et al.*, 2002b). GES-2 peuvent conférer une résistance à l'imipénème contrairement aux enzymes GES-1 (Poirel *et al.*, 2002b). En outre, l'identification de cette enzyme a montré que les BLSEs de classe A peuvent devenir des carbapénèmases à faible activité, à travers la substitution d'un acide aminé (Nordmann et Poirel, 2002).

De nouvelles variantes de l'enzyme GES-1 ont été rapportées. GES-5 a été isolée chez *P. aeruginosa* au Brésil, en Afrique du Sud, en Espagne (Da Fonseca *et al.*, 2007; Labuschagne *et al.*, 2008; Viedma *et al.*, 2009) et plus récemment en Turquie (Iraz *et al.*, 2014). GES-9 a été rapportée en France (Poirel *et al.*, 2005). L'enzyme GES-9 diffère de GES-1 par une substitution Gly243Ser. Elle est inhibée par l'acide clavulanique et l'imipénème et hydrolyse l'aztréonam (Poirel *et al.*, 2005). Par la suite, la BLSE GES-13 a été rapportée en Grèce (Kotsakis *et al.*, 2010) et la BLSE GES-18 en Belgique (Bebrone *et al.*, 2013). Les gènes codant ces enzymes GES sont situés sur des intégrons de classe 1 (Poirel *et al.*, 2002b).

La BLSE de type IBC-2 (actuellement appelée GES-8), a été rapportée pour la première fois en Grèce dans un isolat clinique de *P. aeruginosa*, probablement à localisation chromosomique (Mavroidi *et al.*, 2001). Il s'agit d'une variante de GES-1 avec une seule substitution (Ala125Leu) (Strateva et Yordanov, 2009).

D'autres types de BLSEs de classe A d'Ambller ont été rapportés. Les BLSEs de type BEL (Belgium) ont été rapportées dans une étude multicentrique entre 2004 et 2008 en Belgique (Glupczynski *et al.*, 2010). Le gène *bla_{BEL-1}* codant cette enzyme fait partie d'un intégron de classe 1, In120, localisé sur un transposon chromosomique (Strateva et Yordanov, 2009).

Les BLSEs de classe D, également appelées « oxacillinasés à spectre étendu » (ES-OXA), dérivent des oxacillinasés classiques à spectre restreint, OXA-2 (OXA-15 et OXA-32) et de l'OXA-10 (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19 et -28) par des mutations ponctuelles (Poirel *et al.*, 2001a). L'enzyme OXA-10 a été rapportée en Turquie (Aktas *et al.*, 2005), dans le nord-ouest algérien (Drissi *et al.*, 2008) et par la suite en Tunisie (Ktari *et al.*, 2011) (Fig.1.1).

Les BLSEs de classe D sont actives sur l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. A l'exception d'OXA-18, l'activité de ces enzymes n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamasés. La plupart des oxacillinasés à spectre étendu sont codées par des gènes présents sur des plasmides ou des intégrons (Naas et Nordmann, 1999), ce qui contribue à leur diffusion facile et à une augmentation de leur prévalence dans le bassin méditerranéen. La majorité de ces BLSEs ont été isolées en Turquie (Hall *et al.*, 1993; Danel *et al.*, 1995b; Danel *et al.*, 1997; Danel *et al.*, 1998; Danel *et al.*, 1999) et en France (Mugnier *et al.*, 1998a; Mugnier *et al.*, 1998b; Poirel *et al.*, 2002a; Hocquet *et al.*, 2010). La BLSE OXA-18 est codée par le gène chromosomique *bla_{OXA-18}* (Philippon *et al.*, 1997). Sa séquence en acides aminés n'est pas identique aux autres oxacillinasés de classe D produites par *P. aeruginosa*. Elle a été décrite pour la première fois en France chez un patient préalablement hospitalisé en Italie (Philippon *et al.*, 1997) et par la suite en Tunisie avec une émergence d'OXA-18 entre 1998 et 2000 (Kalai *et al.*, 2007).

Plus récemment, une nouvelle β -lactamasés de Classe D à activité carbapénémase, l'OXA-198, a été rapportée en Belgique chez les souches de *P. aeruginosa* (El Garch *et al.*, 2011).

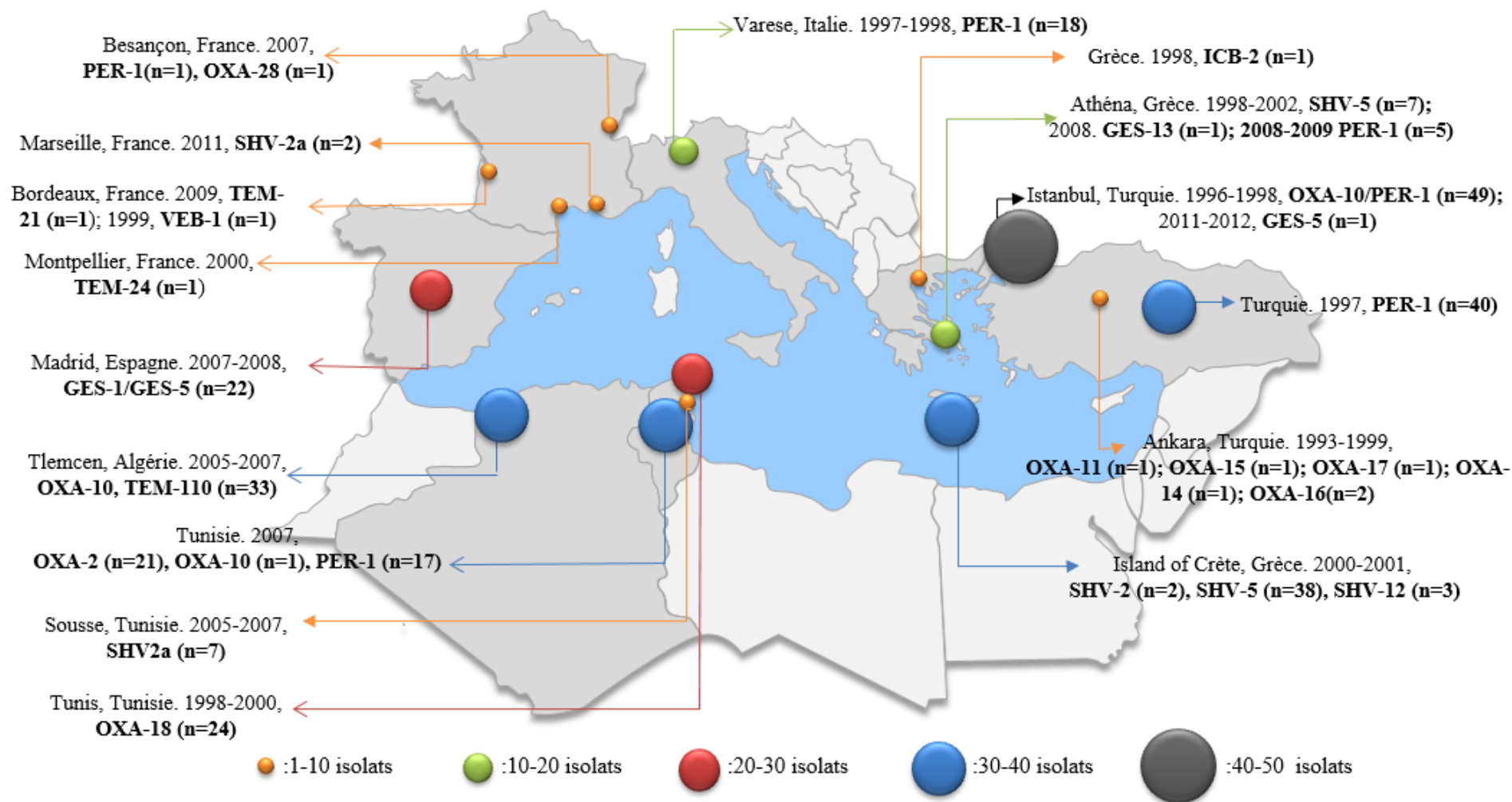


Figure 1.1 β -lactamases de Classe A et D rapportées chez *P. aeruginosa* dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013)

Les carbapénèmases de type Métallo- β -lactamases (MBLs) sont des enzymes appartenant à la classe B d'Ambler (métallo-enzymes). Depuis l'apparition des enzymes IMP et VIM dans les années 90 (Watanabe *et al.*, 1991;Lauretti *et al.*, 1999), les MBLs sont devenues les carbapénèmases les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le Zinc. En outre, l'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents (EDTA). Ce sont des métalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques, qui ont une activité catalytique beaucoup plus forte que les autres β -lactamases et hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam (Nordmann et Poirel, 2002). Ces carbapénèmases acquises constituent actuellement sept groupes décrits chez *P. aeruginosa* : IMP (active sur l'IMiPenem), VIM (Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase), SPM (Sao-Paulo Metallo- β -lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase) et, plus récemment NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) et FIM-1(Cornaglia *et al.*, 2011). Les types IMP et VIM demeurent les MBLs les plus rapportées dans le bassin méditerranéen chez *P. aeruginosa*.

La première MBL, IMP-1 a été décrite chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées entre 1994 et 1996 au Japon (Senda *et al.*, 1996). Le gène a été localisé sur un plasmide de grande taille (36 kb) et faisait partie d'un gène cassette situé dans un intégron IN31 de classe 1. Par la suite, entre 2000 à 2001, d'autres variantes de la MBL, IMP, ont été rapportées dans diverses bactéries à Gram négatif à travers le monde (Strateva et Yordanov, 2009). L'Italie est le premier pays européen à avoir signalé la présence de métallo- β -lactamases acquises de type IMP à savoir, l'IMP-2, l'IMP-12 et l'IMP-13 (Cornaglia *et al.*, 2011). *bla*_{IMP-13}, d'abord détecté dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en provenance d'Italie (Toleman *et al.*, 2003), a été impliqué par la suite dans plusieurs épidémies relativement importantes (Rossolini *et al.*, 2008). *bla*_{IMP-1} a été rapporté en Turquie (Ozgumus *et al.*, 2007). Plus récemment, une souche productrice de la MBL, IMP-18, a été rapportée en France (Hocquet *et al.*, 2010) et la première détection de *P. aeruginosa* productrice d'IMP-15 en Europe a été rapportée dans une étude entre 2009 et 2011 chez deux patients hospitalisés en Espagne (Gilaranz *et al.*, 2013) et par la suite en Liban (Al Bayssari *et al.*, 2014).

IMP-13, IMP-1, IMP-18 et IMP-15 demeurent les seules MBLs de type IMP à avoir été rapportées dans les pays méditerranéens.

Parmi les MBLs, le type VIM est le plus répandu dans le monde (Cornaglia *et al.*, 2011). La carbapénèmase de type VIM-1 rapportée la première fois en Méditerranée chez une souche de *P. aeruginosa* nosocomiale isolée à l'hôpital universitaire de Vérone, en Italie, en 1997 (Lauretti *et al.*, 1999), a été le premier représentant de cette nouvelle famille de MBLs acquise.

Les enzymes de type VIM, notamment l'enzyme VIM-2 décrite la première fois chez un patient hospitalisé à Marseille en France (Poirel *et al.*, 2000), sont les MBLs prédominantes dans la Méditerranée et ont été rapportés dans plusieurs pays du bassin méditerranéen, incluant les pays européens ; l'Italie (Cornaglia *et al.*, 2000; Lagatolla *et al.*, 2004; Riccio *et al.*, 2005; Mazzariol *et al.*, 2011), la Grèce (Tsakris *et al.*, 2000; Mavroidi *et al.*, 2000; Pournaras *et al.*, 2002; Siarkou *et al.*, 2009), la France (Aubron *et al.*, 2005), l'Espagne (Juan *et al.*, 2008; Tato *et al.*, 2010; Viedma *et al.*, 2012), la Croatie (Sardelic *et al.*, 2003; Sardelic *et al.*, 2012) et la Turquie (Bahar *et al.*, 2004; Yakupogullari *et al.*, 2008) ainsi que les pays d'Afrique incluant l'Algérie (Touati *et al.*, 2013), la Tunisie (Mansour *et al.*, 2009b; Hammami *et al.*, 2010; Ktari *et al.*, 2011; Hammami *et al.*, 2011), le Kenya (Pitout *et al.*, 2008) et l'Afrique de Sud (Jacobson *et al.*, 2012) (Fig.1.2).

D'autres enzymes de type VIM ont été décrites dans les pays méditerranéens, à noter l'enzyme VIM-4 et VIM-17 en Grèce (Pournaras *et al.*, 2002; Siarkou *et al.*, 2009), VIM-5 et VIM-38 en Turquie (Bahar *et al.*, 2004; Iraz *et al.*, 2014), VIM-13 et VIM-20 en Espagne (Juan *et al.*, 2008; Riera *et al.*, 2011) ainsi que VIM-14 en Italie (Mazzariol *et al.*, 2011) (Fig.1.2).

Une nouvelle MBL de type FIM-1 a été identifiée en 2007 en Italie (Pollini *et al.*, 2013).

Plus récemment, une nouvelle métallo- β -lactamase, NDM-1 (New Delhi M β L), a été identifiée pour la première fois chez les souches de *P. aeruginosa*, en Serbie (Jovcic *et al.*, 2011). Cette enzyme aurait déjà une diffusion internationale importante. En outre, 6 sur 55 cas de NDM-1 associés aux voyages rapportés en Europe avaient un lien avec la région des Balkans, sans doute la Serbie (y compris le Kosovo), le Monténégro et la Bosnie-Herzégovine (Jovcic *et al.*, 2011). Une souche productrice de cette MBL a été détectée en France chez un patient précédemment hospitalisé en Serbie (Janvier *et al.*, 2013).

Depuis quelques années, les carbapénèmases de classe A telles que les KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) qui tendent à diffuser au sein des Entérobactéries (Merens,

2011) ou encore les GES-2, restent rares chez les souches de *P. aeruginosa* et n'ont pas encore été rapportées dans les pays de la Méditerranée (Naas *et al.*, 2013).

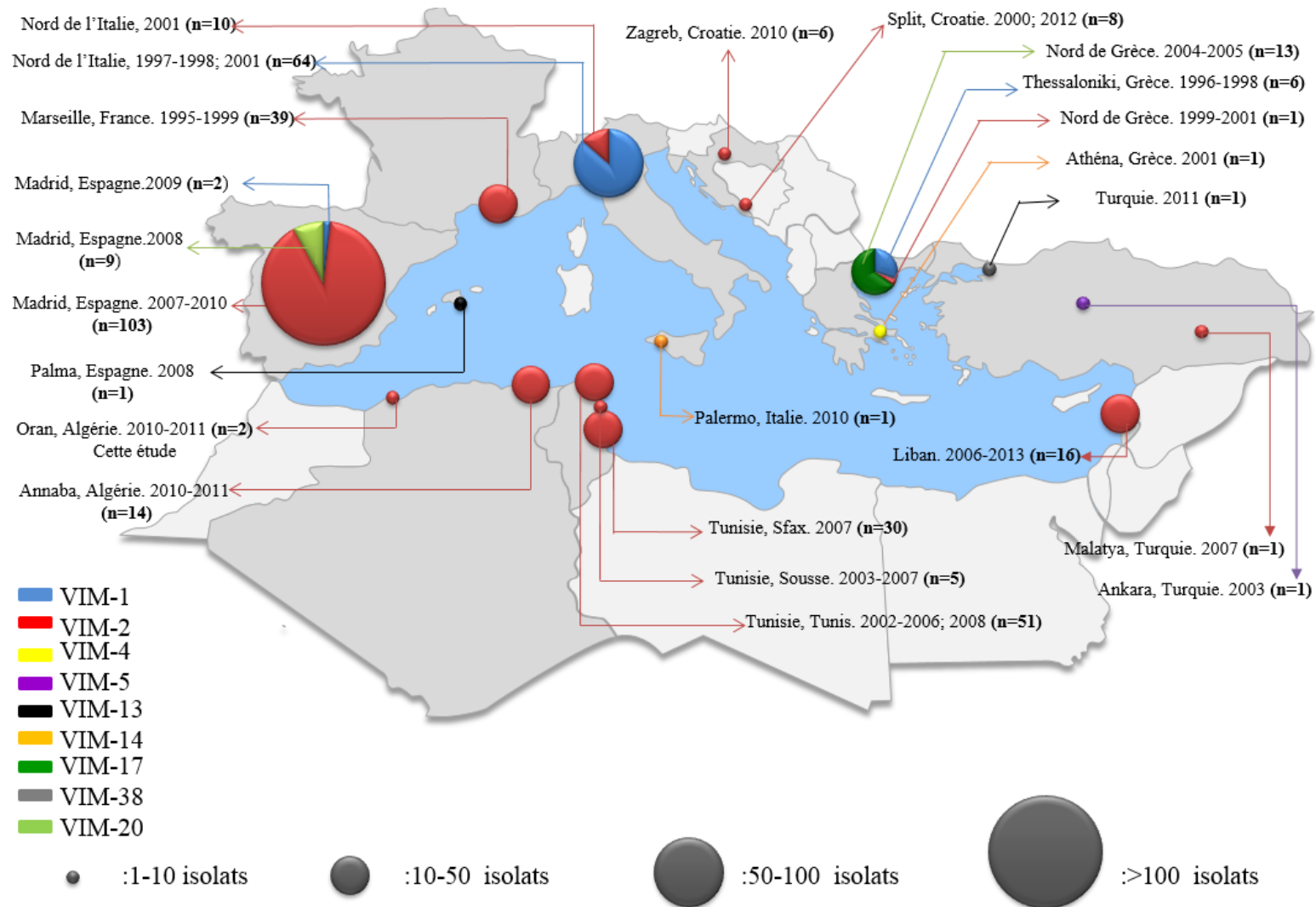


Figure 1.2 MBLs de type VIM rapportées chez *P. aeruginosa* dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013)

1.2.2 Résistance non enzymatique

La membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue une barrière semi-perméable qui s'oppose à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives. La membrane externe de *P. aeruginosa* n'est perméable qu'à 8% par rapport à la membrane externe d'*Escherichia coli* (Hancock et Brinkman, 2002).

Pour franchir la membrane externe, les β -lactamines empruntent les canaux protéiques transmembranaires appelés porines. L'analyse du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier 163 protéines de la membrane externe (OMPs ; Outer Membrane Proteins), dont 72 sont regroupées en trois grandes familles de porines (Hancock et Brinkman, 2002).

Contrairement aux autres molécules, les carbapénèmes n'utilisent pas la porine majoritaire OprF (*outer membrane protein F*) pour pénétrer dans la bactérie, mais une porine spécifique dénommée OprD (*outer membrane protein D*), une protéine de 420 acides aminés (Huang *et al.*, 1995).

La résistance à l'imipénème est apparue juste après le début de l'utilisation clinique de cette molécule en 1987 (Li *et al.*, 2012). Elle a été rapidement liée à l'absence d'une protéine de la membrane externe de 45~49 kiloDalton (kDa), l'OprD (Li *et al.*, 2012), qui a été perdue sous l'effet de mutations chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème (Hancock et Brinkman, 2002). En comparaison avec l'imipénème, les autres carbapénèmes, le méropénème et le doripénème, sont moins affectés par la déficience de l'OprD (Strateva et Yordanov, 2009; Ocampo-Sosa *et al.*, 2012). Cette β -lactamine ressemble fortement à un dipeptide contenant un résidu chargé positivement. La porine OprD est une porine spécifique qui se lie à des acides aminés basiques tels que l'histidine, la lysine et l'arginine, des dipeptides contenant un résidu basique, l'imipénème et gluconate (Huang *et al.*, 1995). En effet, la résistance aux carbapénèmes résultant de la perte de la porine OprD nécessite la présence d'AmpC inductible ou dérégulée de manière stable (Livermore, 1992). Une étude en Tunisie rapporte que la résistance aux carbapénèmes des souches cliniques de *P. aeruginosa* était due à deux mécanismes combinés : une diminution de la transcription du gène de l'*oprD* et une hyperexpression du système d'efflux MexAB-OprM (Hammami *et al.*, 2009).

De nombreux antibiotiques sont exclus de *P. aeruginosa*. Cette exclusion a été longtemps attribuée à l'imperméabilité de la membrane externe jusqu'à la découverte des systèmes d'efflux. Ce sont des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des

molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur (Piddock, 2006). Ces systèmes de pompes nécessitent la juxtaposition d'un transporteur (une protéine associée à la membrane cytoplasmique) et d'un canal localisé dans la membrane externe afin de permettre l'excrétion d'une molécule indésirable du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en transitant par le périplasme (Nikaido, 1996).

De nombreuses pompes d'efflux ont été décrites chez *P. aeruginosa* qui sont désignées d'après leurs composants respectifs avec dans l'ordre : la protéine de fusion membranaire, la pompe et la protéine de membrane externe (MexAB-OprM ; MexCD-OprJ ; MexEF-OprN et MexXY-OprM) (Poole, 2004). Ces systèmes d'efflux ne sont pas exprimés de la même façon ; MexAB-OprM et MexXY-OprM sont produites constitutivement chez les souches de *P. aeruginosa*, alors que les deux autres systèmes d'efflux sont réprimés dans les souches sauvages (Masuda *et al.*, 2000; Strateva et Yordanov, 2009).

En plus de leur rôle dans la résistance naturelle, les pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM peuvent contribuer, lorsqu'elles sont surproduites, à accroître la résistance de la bactérie à plusieurs familles d'antibiotiques. Ce phénomène est lié à la survenue de mutations spontanées dans les gènes régulateurs de ces systèmes.

MexAB-OprM, MexCD-OprJ, et MexXY-OprM confèrent une résistance aux β -lactamines (Poole, 2011). Ainsi, la surproduction de MexAB-OprM entraîne une diminution de sensibilité à la plus large gamme de β -lactamines (parmi ces pompes) et est le plus souvent liée à la résistance β -lactamines chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie (Drissi *et al.*, 2008) ainsi que d'autre pays de la Méditerranée dont la Tunisie (Hammami *et al.*, 2009), l'Égypte (Gad *et al.*, 2007) et la France (Boutoille *et al.*, 2009). En effet, la surproduction des systèmes d'efflux MexEF-OprN, MexCD-OprJ, et MexXY-OprM peut être active sur les carbapénèmes sauf l'imipénème (Poole, 2011). Pourtant, le système d'efflux MexAB-OprM semble avoir une contribution mineur à la résistance aux carbapénèmes dans cet organisme et fonctionne généralement en association avec d'autres mécanismes (Hammami *et al.*, 2009; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009; Poole, 2011; Lee et Ko, 2012). MexAB-OprM a été également impliqué dans la résistance à la ticarcilline et son expression est liée statistiquement à la résistance à l'aztréonam (Hocquet *et al.*, 2007). La surproduction des systèmes MexCD-OprJ et MexXY-OprM entraîne la résistance aux β -lactamines zwitterioniques (céfépime, cefpirome) (Masuda *et al.*, 2000; Livermore, 2002).

1.3 Résistance aux aminosides

Les aminosides forment une famille d'antibiotiques connue depuis 1944, année de la découverte de la streptomycine. Ce sont des antibiotiques à usage quasi exclusivement hospitalier et qui paraissent particulièrement utiles de par leur large spectre et leur vitesse de bactéricidie et ont été traditionnellement utilisés pour le traitement de graves infections à Gram négatif (Hermann, 2007). Ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse des protéines par l'intermédiaire de leur liaison au site aminoacyl de l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale 30S entraînant la destruction bactérienne (Shakil *et al.*, 2008). Un certain nombre d'aminoglycosides sont couramment utilisés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* comme la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine (Poole, 2005). Leur utilisation est toutefois confrontée au développement de plusieurs mécanismes de résistance (Poole, 2005). Il s'agit notamment de la désactivation de ces antibiotiques par la famille des enzymes-modifiant les aminosides (AMEs) agissant sur des sites spécifiques de ces aminoglycosides et représentent le mécanisme majeur de résistance à cette famille d'antibiotique. D'autres mécanismes de résistance ont été décrits, incluant, la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale, l'expulsion de l'antibiotique par les systèmes d'efflux ainsi que la méthylation du site de liaison des aminoglycosides (Shakil *et al.*, 2008).

Trois classes d'enzymes (AMEs) ont été décrites, à savoir les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-*o*-nucléotidyl transférases (AAD ou ANT) et les aminosides-*o*-phosphotransférases (APH). Leurs gènes étant fréquemment portés par des éléments mobiles (intégrons, plasmides ou transposons) et sont souvent associés à la résistance aux β -lactamines et aux quinolones (Ramirez et Tolmasky, 2010). La nomenclature de ces enzymes est constituée d'une à trois lettres identifiant l'activité de l'enzyme suivie par le site de la modification entre parenthèses (classe), un chiffre romain correspondant au profil de résistance qu'ils confèrent aux cellules hôtes (sous-classe), et une lettre minuscule qui est un identificateur individuel (Ramirez et Tolmasky, 2010). Les enzymes ANT(2')-I (détermine la résistance à la gentamicine et à la tobramycine), AAC(3)-I (résistance à la gentamicine), AAC(6')-II (résistance à la tobramycine, nétilmicine et gentamicine) et AAC(6')-Ib (résistance à la tobramycine et à l'amikacine) sont les plus répandues chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* (Strateva et Yordanov, 2009). Leur production simultanée chez une même bactérie se traduit par une résistance à tous les aminosides disponibles (tobramycine, amikacine, nétilmicine et gentamicine).

L'AAC(6')-Ib semble être l'acétyltransférase le plus important sur le plan clinique. Son variant AAC(6')-Ib-cr initialement détecté chez les entérobactéries, se traduit par une sensibilité réduite aux quinolones chez *P. aeruginosa* (Libisch *et al.*, 2008).

Une étude menée dans plusieurs pays européens incluant la Turquie, la Grèce, l'Espagne et la France, indique que le gène *aac(6')-II* était le plus répandu chez les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux aminosides, suivi par le gène *ant(2'')-I* (Miller *et al.*, 1997).

En Algérie, les gènes *aac(3')-II*, *aadA1* et *aadA13* ont été identifiés chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* associés au gène *bla_{VIM-2}* chez quelques souches (Sefraoui *et al.*, 2013). D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés en Algérie. Les gènes *aadB* et *aacA4* ont été identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase VIM-2 (Touati *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme de résistance aux aminosides a été décrit chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, il s'agit de la résistance par modification de la perméabilité membranaire qui réduit la pénétration intracellulaire des aminosides. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de la résistance aux aminosides par imperméabilité membranaire dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose (Poole, 2005). En Turquie, ce mécanisme de résistance était responsable de 66,6% de résistance aux aminosides (Over *et al.*, 2001).

Chez *P. aeruginosa*, seul le système d'efflux actif MexXY-OprM est capable d'exporter les aminosides vers le milieu extérieur et d'entraîner une résistance à cette famille d'antibiotiques (Masuda *et al.*, 2000). Naturellement réprimé chez les souches sauvages, ce système peut être surproduit chez certains mutants. Il a été suggéré que la protéine MexXY peut agir aussi avec d'autres protéines de la membrane externe, OpmB, OpmG, et OpmI, formant ainsi des systèmes d'efflux actifs à trois composants (Vogne *et al.*, 2004). Ce mécanisme de résistance aux aminosides semble être la principale cause de résistance non enzymatique à cette famille d'antibiotiques chez *P. aeruginosa* en France, en particulier parmi les isolats provenant de malades atteints de mucoviscidose (Vogne *et al.*, 2004).

Plus récemment, la méthylation de l'ARNr 16S a émergé comme un nouveau mécanisme de la résistance aux aminosides parmi les agents pathogènes à Gram négatif telle que *P. aeruginosa*, capable de modifier non pas l'aminoside mais la structure ribosomale sur lequel il se fixe, l'ARN 16S. Le gène *RmtA* (Resistance methylase transferase) codant ce

mécanisme a été décrit chez *P. aeruginosa* au Japon en 2003 (Yokoyama *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2004). Depuis 2003, de nombreuses études ont rapporté la présence de ce nouveau mécanisme de résistance et sa propagation dans différentes espèces, dans différentes parties du monde (Doi et Arakawa, 2007). Ces enzymes confèrent des hauts niveaux de résistance aux aminosides cliniquement utilisés, comme l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine (Doi et Arakawa, 2007).

RmtD, une nouvelle 16S ARNr méthylase, a été identifiée chez une souche de *P. aeruginosa* isolée au Brésil en 2005 et associée à la production de métallo- β -lactamase SPM-1 (Doi *et al.*, 2007). Cette enzyme confère un haut niveau de résistance aux aminosides (amikacine, gentamicine et tobramycine) (Doi *et al.*, 2007). La production simultanée d'une méthylase de l'ARN 16S et d'une métallo- β -lactamase a donc pour conséquence de rendre les souches résistantes à presque tous les aminosides et toutes les β -lactamines. La coexistence de ces deux mécanismes transférables illustre comment les souches de *P. aeruginosa* peuvent évoluer rapidement vers la toto-résistance. Bien qu'ils soient encore peu répandus chez *P. aeruginosa*, les méthylases de l'ARN 16S sont décrites de plus en plus chez les entérobactéries à travers le monde (Galimand *et al.*, 2005).

1.4 Résistance aux fluoroquinolones

Depuis la découverte de l'acide nalidixique, en 1962 (Leshner *et al.*, 1962), les quinolones ont évolué et sont devenues des agents importants et efficaces dans le traitement des infections bactériennes. En 1978, apparurent les fluoroquinolones ou quinolones de 2eme génération qui résultent de modifications de la structure chimique des molécules initiales par l'adjonction d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7 (Ball, 2000). Les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV bactérienne, enzymes qui démêlent l'ADN pendant la réplication.

Les fluoroquinolones, en particulier la ciprofloxacine, sont souvent utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, ce qui a conduit à l'émergence de résistance acquise au sein de l'espèce. Deux principaux mécanismes conduisent à la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa*: des changements structurels dans les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV qui représentent les cibles des FQs et l'efflux actif (Lee *et al.*, 2005a).

La modification de la cible primaire pour les fluoroquinolones (ADN gyrase, également connue sous le nom de topoisomérase II) se produit par des mutations ponctuelles dans la région où se fixe l'antibiotique appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions) dans les gènes *gyrA* / *gyrB*, qui code les deux sous unités de l'enzyme ADN gyrase, GyrA, (97-kDa) et GyrB (90-kDa) (Jacoby, 2005).

Les modifications de la cible secondaire (topoisomérase IV) se produisent à la suite de mutations ponctuelles dans les gènes *parC* et *parE* codant deux sous-unités de cette enzyme, ParC (75 kDa) et ParE (70 kDa) respectivement (Jacoby, 2005).

La surproduction des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN est à l'origine d'une résistance modérée aux fluoroquinolones ainsi qu'à d'autres classes d'antibiotiques (Wang *et al.*, 2007). Un nouveau membre de la famille des pompes à efflux tripartite, MexV (protéine de fusion de membrane)-MexW (de type RND protéine membranaire)-OprM, qui confère une résistance aux fluoroquinolones, a été décrit chez *P. aeruginosa* en 2003 (Li *et al.*, 2003). Ainsi, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est attribuable à l'association des surproductions de pompes à efflux et des mutations dans les gènes codant ADN gyrase et la topoisomérase IV (Nakajima *et al.*, 2002).

1.5 Résistance à la Colistine

Les polymyxines forment une famille d'oligopeptides cycliques antimicrobiens synthétisés par la bactérie à Gram positif, *Bacillus polymyxa*. L'effet bactéricide des polymyxines est obtenu par action au niveau de la membrane cytoplasmique. Ces antibiotiques déplacent les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} qui stabilisent les molécules du lipopolysaccharide (LPS), principaux constituants de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, modifiant ainsi la perméabilité de leur membrane externe (Lee *et al.*, 2014). Il s'en suit une fuite des composés cellulaires et la mort des bactéries (Falagas *et al.*, 2010). La colistine (polymyxine E) a également une activité anti-endotoxine en neutralisant le peptide A du LPS (Falagas et Kasiakou, 2005). L'émergence et la propagation de souches de *P. aeruginosa* multirésistantes aux antibiotiques a conduit à la résurgence de l'utilisation des antibiotiques polymyxine tels que la polymyxine B et la colistine comme agents thérapeutiques (Nation et Li, 2009). Pourtant, les bacilles pyocyaniques sont parvenus à modifier la composition de leur membrane externe de façon à la rendre imperméable à ces deux agents par une modification déterminée de la composante lipidique A du LPS (Moskowitz *et al.*, 2004), ce

qui entraîne une réduction de la charge nette négative de la membrane externe (Vidaillac *et al.*, 2012), soit par des mutations ou par l'activation de systèmes membranaires complexes appelés « systèmes de régulation à deux composants » tels que ParR/S (Muller *et al.*, 2011). Ceci a conduit à l'apparition de souches *P. aeruginosa* résistantes aux polymyxines signalées à travers le monde entier (Landman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011), y compris la Méditerranée en Grèce (Falagas *et al.*, 2008).

1.6 Résistance par formation de Biofilm

La diminution de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries formant des biofilms est vraisemblablement due à la combinaison de plusieurs mécanismes (Walters, III *et al.*, 2003). Mais il reste encore de nombreux mécanismes mal compris. La formation d'un biofilm, ou la production d'une quantité massive d'alginate (polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-gulonique) par les souches de *P. aeruginosa* crée une barrière permettant aux bactéries de persister et de se protéger des défenses immunitaires de l'hôte et l'action bactéricide des antibiotiques (Costerton *et al.*, 1999). Ce mode de croissance est associé à la nature chronique des infections ultérieures et à leur résistance inhérente aux antibiotiques (Costerton *et al.*, 1999). Les infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose sont généralement associées aux biofilms (Stewart et Costerton, 2001). De plus, différentes infections nosocomiales liées à l'utilisation de cathéters veineux centraux, cathéters urinaires, prothèses de valves cardiaques et appareils orthopédiques, sont clairement associées à la formation de biofilms qui adhèrent à la surface du biomatériau (Stewart et Costerton, 2001).

Plusieurs études ont rapportées que les fluoroquinolones, comme l'ofloxacine et la ciprofloxacine, pénètrent les biofilms de *P. aeruginosa* facilement tandis que les aminoglycosides, tels que la tobramycine et la gentamicine, diffusent plus lentement. Ces études suggèrent que la liaison des aminosides chargés positivement aux polymères extracellulaires de matrice du biofilm à charge négative, tel que l'alginate, retarde la pénétration de ces agents (Stewart, 2002). Bien que cela puisse être le cas de certains agents antimicrobiens, il a été montré que pour d'autres, ils peuvent pénétrer la matrice mais ne peuvent pas tuer les cellules dans le biofilm (Walters, III *et al.*, 2003)

Les souches de *P. aeruginosa* formant un biofilm sont beaucoup plus résistantes à la tobramycine que les souches vivant à l'état planctonique (Nickel *et al.*, 1985). Alors qu'une

autre étude suggère que la formation de biofilms peut être une réaction spécifique, défensive, induite par la présence d'antibiotiques tel que les aminoglycosides (Hoffman *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, neuf pompes RND (Resistance Nodulation cell Division) ont été identifiées et caractérisées comme mécanisme de résistance des formes planctoniques (Zhang et Mah, 2008). Il a été suggéré qu'elles jouaient également un rôle dans la résistance aux antibiotiques des biofilms. Une étude suggère que MexAB-OprM et MexCD-OprJ sont impliqués dans la résistance du biofilm de *P. aeruginosa* à l'azithromycine macrolides (Gillis *et al.*, 2005). Par la suite, Zhang et Mah ont mis en évidence un nouveau système d'efflux spécifique aux biofilms de *P. aeruginosa* contribuant à la résistance à plusieurs antibiotiques (Zhang et Mah, 2008). Un nouveau mécanisme de résistance à la colistine, impliquant une pompe à efflux, a été mis en évidence dans une population particulière du biofilm. Il s'agit d'une combinaison du rôle de la pompe MexAB-OprM et de l'opéron *prm*, qui modifie la structure du LPS (Pamp *et al.*, 2008).

Chapitre II

Matériel & Méthodes

2.1 Souches bactériennes étudiées

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* incluses dans cette étude proviennent d'une étude multicentrique incluant trois hôpitaux universitaires régionaux du nord-ouest algérien, le centre hospitalo-universitaire (CHU) d'Oran (institution publique de 2142 lits), le CHU de Tlemcen (institution publique de 800 lits) ainsi que le CHU de Sidi Bel Abbes (institution publique de 627 lits). L'ensemble des souches a été isolé à partir de prélèvements cliniques ou de prélèvements d'environnement positifs à *P. aeruginosa* et réalisés dans différents services des CHU, essentiellement les services de soins intensifs. Ces prélèvements étaient à visée épidémiologique (dépistage). Le recueil des souches a été effectué entre janvier 2009 et novembre 2012.

2.2 Identification des souches

L'identification des souches a été réalisée selon les tests conventionnels par les galeries API 20NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et confirmée par le spectromètre de masse MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight mass Spectrometry Method) (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2.2.1 Galerie API 20NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est constituée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

2.2.2 MALDI-TOF

(Seng *et al.*, 2010)

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides. L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible.

Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre.

2.2.2.1 Préparation de 1 ml de la matrice MALDI

- Dans un tube polypropylène 1.5 ml, introduire 2 pointes de spatules d'alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA).
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile HPLC.
- Ajouter 475 µl d'eau HPLC.
- Ajouter 25 µl de TFA (trifluoroacetic acid).
- Vortexer ou secouer vigoureusement.
- Soniquer 10 min puis centrifuger 5 min à 13000 g.
- Transférer le surnageant dans un tube polypropylène 1.5 ml propre.

2.2.2.2 Réalisation des dépôts sur cible MALDI

- Déposer 2 spots de 1.5 µl témoin positif (T+) et recouvrir chaque dépôt de 1.5 µl de matrice saturée.
- Sur la ligne suivante même colonne, déposer 2 spots du témoin négatif (1.5 µl de matrice)
- Sur les lignes suivantes, déposer les échantillons en fine couche homogène en deux exemplaires minimum : prélever une petite quantité de colonies bactériennes différentes pour un même échantillon à l'aide d'une pointe de cône de pipette 10 µl.
- Une fois tous les dépôts effectués, déposer 1.5 µl de matrice sur chaque spot.
- Laisser sécher sous PSM puis introduire cette cible MALDI dans le spectromètre de masse Microflex LT
- Démarrer l'ordinateur associé au spectromètre utilisé puis le logiciel FlexControl (Bruker Daltonics).

2.2.2.3 Lecture

Les résultats d'une cible sont exploitables seulement si les témoins T+ et T- sont valides:

- T+ doit correspondre à *Escherichia Coli* avec un score > 1.9,
- T- doit correspondre à un score sans identification < 1.7.

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés, sous Biotyper RTC, par un score entre 0 à 3 (Tab.2.1).

Tableau 2.1 Score d'identification des bactéries

Score	0-1.7	1.7-1.9	1.9-3
Couleur	Rouge	Jaune	Vert
Identification bactérienne	Aucune	Genre bactérien	Espèce bactérienne

L'identification d'un germe est validée lorsque le score est supérieur à 1,9 pour les 2 dépôts (même germe retrouvé). Retenir le meilleur score d'identification MS de chaque échantillon. Si l'un des deux scores de l'échantillon est inférieur à 1,9 ou si l'on retrouve 2 germes différents, l'identification n'est pas valide. Déposer cet échantillon sur deux positions supplémentaires et relancer son analyse.

2.3 Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) et les critères de lecture et d'interprétation ont été ceux du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (www.sfm.asso.fr). Douze antibiotiques ont été testés : la Ticarcilline (75 µg), la Pipéracilline (75 µg), la Ticarcilline+l'acide clavulanique (75/10 µg), la Pipéracilline+tazobactam (75/10 µg), la Ceftazidime (30 µg), l'Imipénème (10 µg), l'Aztréonam (30 µg), l'Amikacine (30 µg), la Tobramycine (10 µg), la Gentamicine (15 µg), la Ciprofloxacine (5 µg) et la Colistine (50µg).

La recherche de β -lactamase à spectre étendu (Lee *et al.*, 2005b) se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme, en disposant des disques d'antibiotiques ceftazidime et aztréonam à une distance de 20 à 30 mm du disque contenant de l'acide clavulanique. Pour les souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime, l'inhibition de l'hyperproduction de céphalosporinases a été réalisée sur gélose MH additionnée de cloxacilline (Orbénine®) avec une concentration finale de 500 mg/l (De Champs *et al.*, 2002). Ce test est significatif

lorsque le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques d'antibiotiques céphalosporines de troisième génération augmente d'au moins 8 mm avec un rétablissement de la sensibilité.

2.3.1 Technique

- A partir d'une culture pure de 18-24 heures sur milieu gélosé non sélectif, réaliser une suspension de 0.5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) dans 5 ml d'eau physiologique (0,9% NaCl).
- Réaliser une dilution de $1/10^e$ ($\sim 10^7$ UFC/mL) dans 10 ml d'eau physiologique à 0.9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex.
- Ensemencer cette dilution par écouvillonnage sur des boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton.
- Appliquer les disques d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile en disposant les disques d'antibiotiques C3G et aztréonam à une distance de 20 à 30 mm du disque contenant l'acide clavulanique.
- Laisser les boîtes 20 mn à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 18-24h à 37°C.

2.3.2 Lecture

- La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le CASFM et classer les bactéries dans l'une des catégories : **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistante**.
- Interpréter les phénotypes de résistance aux β -lactamines.

2.4 Test à l'EDTA

La recherche des métallo- β -lactamases (MBLs) a été effectuée sur les souches résistantes à l'IPM en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IPM en chélatant les ions Zn^{2+} indispensables à l'activité de la MBL et la rendant ainsi inactive. Deux techniques phénotypiques ont été réalisées afin de rechercher la présence probable de MBLs: le test IMP-EDTA (the combination disk test (CDT) (Gupta *et al.*, 2006) et le test de synergie avec doubles disques (DDST) (Lee *et al.*, 2003).

2.4.1 Technique

- Ensemencer la suspension bactérienne d'opacité 0,5 Mc Farland sur gélose Mueller-Hinton par inondation puis laisser sécher.
- Déposer deux disques d'imipénème (10 µg) à 20mm centre à centre l'un comme témoin, et sur l'autre, un volume contenant 4 µl d'EDTA (0.5 M, pH 8).
- Déposer un autre disque d'IPM (10µg) à 20mm centre à centre d'un disque non imprégné stérile sur lequel a été déposée 10 µl d'EDTA (0.5 M, pH 8).
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C.
- Un témoin positif correspondant à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de la métallo-β-lactamase VIM a été utilisé.

2.4.2 Lecture

Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA était supérieur d'au moins 8mm à celui obtenu avec le disque d'IPM seul pour la première technique, et dont on observe une synergie entre les deux disques pour la deuxième technique, ont été considérées comme souches productrices de MBLs.

2.5 Détection de MBL par bandelette E-test

(Petroplou *et al.*, 2006)

Les bandelettes E-test[®] MBL (AB BioMerieux, France) se composent de gradients IMP (4-256 g/ml) et IMP (1-64 g/ml) plus un niveau constant d'EDTA (IMP-EDTA). Le test est effectué en utilisant une procédure E-test standard, en déposant la bandelette sur une gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée par la souche à testée. Après incubation 18 à 24 heures à 37°C, la production de MBL est indiquée par une réduction de la CMI de l'imipénème en présence d'EDTA (rapport CMI de IMP / IMP+EDTA \geq 8) ou l'apparition d'une zone de synergie entre les sections IMP / IMP+EDTA.

2.6 Identification des gènes de résistance par PCR simple

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro* qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN cible.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. Les réactions d'amplification des gènes de résistance aux antibiotiques sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques (Eurogentec) cités dans le tableau ci-dessous (Tab.2.2) dans un thermocycler de type Labnet MultiGene OptiMax 230V TC9610-230 (Fisher) en présence de *Taq* DNA Polymerase (Qiagen®) en respectant les conditions d'utilisation spécifiées par le fournisseur. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tableau 2.2 Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR

Gènes cibles	Amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (pb)	References/source
<i>oprD</i>	OprD-F	GGAACCTCAACTATCGCCAAG	1,412	(Ocampo-Sosa <i>et al.</i> , 2012)
	OprD-R	GTTGCCTGTCGGTCGATTAC		
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	CATACTCGTTGAAGAAGTTAACGG	448	(Kulah <i>et al.</i> , 2010)
	IMP-R	GAGAATTAAGCCACTCTATTGC		
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	5'-TGGTCTACATGACCGCGTCT-3'	766	(Touati <i>et al.</i> , 2013)
	VIM-R	3'-CGACTGAGCGATTTGTGTG-5'		
<i>bla_{NDM-1-like}</i>	NDM-1-F	3'-GCGAACACACAGCCTGACTTT-5'	813	(Diene <i>et al.</i> , 2011)
	NDM-1-R	5'-CAGCCACCAAAGCGATGTC-3'		
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	840	(Kruger <i>et al.</i> , 2004)
	TEM-R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	1,051	(Yagi <i>et al.</i> , 2000)
	SHV-R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC		
<i>bla_{PER}</i>	PER-F	GTAGTATCAGCCCAATCCCC	738	(Melano <i>et al.</i> , 2003)
	PER-R	CCAATAAAGGCCGTCCATCA		
<i>bla_{VEB}</i>	VEB-F	GGAACAACCTTTGACGATTGA	374	(Melano <i>et al.</i> , 2003)
	VEB-R	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
<i>aac(3)-Ia</i>	<i>aac(3)-Ia-F</i>	GACATAAGCCTGTTCGGTT	372	(Noppe-Leclercq <i>et al.</i> , 1999)
	<i>aac(3)-Ia-R</i>	CTCCGAACCTCACGACCGA		
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-F</i>	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395	(Noppe-Leclercq <i>et al.</i> , 1999)
	<i>aac(6')-Ib-R</i>	CCCGCTTTCTCGTAGCA		
<i>aadA</i>	<i>aadA-F</i>	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	(Bakour <i>et al.</i> , 2012)
	<i>aadA-R</i>	TTGTACGGCTCCGCAGTG		
<i>ant(2'')-I</i>	<i>ant(2'')-I-F</i>	GACACAACGCAGGTCACATT	524	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	<i>ant(2'')-I-R</i>	CGCATATCGCGACCTGAAAGC		
<i>aph(3')-VI</i>	<i>aph(3')-VI-F</i>	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716	(Noppe-Leclercq <i>et al.</i> , 1999)
	<i>aph(3')-VI-R</i>	TTCCTTTTGTGTCAGGTC		

2.6.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée, sur un Automate EZ1 à l'aide du kit Qiagen : 51304 Qiamp DNA mini kit (Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

2.6.2 Préparation du mix

La manipulation du mix se fait dans une pièce spéciale sous PSM avec le port de gants pour éviter toute contamination du Mix qui sera par la suite distribué dans des tubes Eppendorf numérotés (Tab.2.3).

Tableau 2.3 Produits du mix PCR

Produits	Réaction pour un échantillon
Master mix (Qiagen®)	12,5µl
Primer 1 (F) (Eurogentec)	0,5µl
Primer 2 (R)	0,5µl
Eau distillée stérile	6,5µl
Volume total du mix	20µl

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, puis 20µl de ce mélange sont distribués dans chaque tube Eppendorf PCR stériles :

- **Témoin négatif** : 5µl d'eau distillé stérile plus 20µl de mix
- **Témoin positif** : 5µl de DNA positif pour 20µl du mix.
- **Echantillons** : 5µl de DNA de notre échantillon est ajouté à 20µl de mix
- **Volume total** : 25µl par échantillon (les témoins ou les échantillons à analyser).

Le mix et les DNA sont transférés dans des tubes Eppendorf de type « Mastercycler personnel » et sont introduits dans le thermocycleur.

2.6.3 Programmation du thermocycleur

Cette réaction est cyclique, et elle se fait en trois étapes :

- **Dénaturation** : consiste à chauffer avec une température élevée pour séparer l'ADN à double brin en brisant les liaisons hydrogènes.
- **Hybridation** : une fois l'ADN séparé, on refroidit rapidement pour que les amorces se fixent à chaque extrémité complémentaire de l'ADN à simple brin.

- **La polymérisation ou élongation** : Après la fixation des amorces, l'ajout de la Taq polymérase et de nucléotide permet la synthèse des nouveaux brins d'ADN.
- Nouvelle amplification.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (Labnet International MultiGene OptiMax Thermal Cycler) selon les conditions suivantes : 15 min à 95°C puis 35 cycles (94°C – 1min, 55°C – 50 sec, 72°C – 1min) et une élongation finale de 7 min à 72°C.

2.6.4 Lecture des résultats de PCRs

2.6.4.1 Préparation du gel d'Agarose

Pour un gel 1%, 4 g d'agarose est versé dans une bouteille à couvercle bleu où sont ajoutés 400 ml de TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA). Ensuite le tout est mis à chauffer dans un four à Micro-onde pendant 10 minutes jusqu'à ce que le liquide devienne limpide. Ainsi, le gel peut être stocké à température ambiante.

Verser dans un verre gradué utilisé pour le coulage du gel 50 ml d'agarose à 1% plus 200µl de BET (Bromure d'éthidium) qui va se fixer sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre la visualisation des bandes d'ADN dans le gel sur la table UV du transilluminateur.

- Couler le gel dans un moule puis déposer un peigne dans le gel afin de réaliser les puits et laisser refroidir à température ambiante pendant 30 minutes puis retirer le peigne.
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse en ajoutant un volume de tampon TBE 0.5X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1mm au-dessus).
- Déposer dans le premier et dernier puit le marqueur de PM (**p**oids **m**oléculaire TrackIt™ 100 bp DNA Ladder) d'une concentration de 0.25µg/µl.
- Prendre un morceau de Parafilm sur lequel est mélangé 7µl de chaque échantillon avec 3µl de tampon de charge (Bleu de Bromo-phénol) qui assure le maintien du dépôt en immersion dans le puit et permet la visualisation de la migration.
- Les deuxième et troisième puits sont réservés au témoin positif et au témoin négatif.

- Déposer les échantillons dans les autres puits.
- Fermer la cuve et brancher l'alimentation de la cuve à de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).
- Appliquer une tension de 130 Volte correspondant à environ 30 minutes de migration.
- Couper l'alimentation quand le colorant a parcouru la distance requise ou laisser la migration arriver jusqu'à 1 cm du bord de la cuve (cette ligne est appelée le front de migration).
- Débrancher le générateur de la cuve.

2.6.4.2 Lecture (Visualisation par Transilluminateur)

La visualisation des bandes d'ADN du gel se fait sur la table UV du transilluminateur dans une chambre noire. En fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés, on repèrera la bande et sa taille respectivement par rapport au témoin positif et au marqueur de PM (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder).

2.6.5 Purification des produits de PCR

- Ajouter aux produits de PCR (20µl), 180µl d'eau ultra-pure puis mettre les 200µl sur la plaque de purification sur membrane de silice.
- Mettre sur pompe à vide (aspiration liquide-ADN sur membrane) 20 min.
- Ajouter 50µl d'eau ultra-pure.
- Agiter sur une plaque agitatrice pendant 20min.
- Transférer l'ADN purifié dans une plaque ou barrettes et conserver à -20°C.

2.6.6 Séquençage

(Sanger *et al.*, 1977)

Le séquençage des échantillons positifs, dans les deux directions, a été fait en utilisant l'ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) selon les indications du fournisseur.

2.6.6.1 Préparation de la réaction du séquençage

La manipulation du mix pour la réaction du séquençage se fait comme une PCR standard dans une cuvette contenant de la glace pilée. Il est distribué dans des tubes Eppendorf

numérotés à raison de 2 cupules pour chaque échantillon à chaque primer (Forward et reverse) (Tab.2.4 ; Tab.2.5).

Tableau 2.4 Produits du mix séquençage

Produits	Réaction pour un échantillon
BigDye® Terminator v1.1	3µl
Primer* Forward ou Reverse	0,5µl
Eau distillée Ultra-pure stérile	4µl
ADN purifié	3µl
Volume total du mix	10,5µl

(*) Pour chaque échantillon un mix de 7µl plus le 0,5µl du reverse et un autre avec le forward.

Tableau 2.5 Programme du thermocycleur

96°C	2 min	} 25 cycles
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

2.6.6.2 Purification au Sephadex®

Préparation d'une plaque de filtration 96 puits de marque millipore A1=Cup1

- Remplir les puits de la plaque avec la poudre Sephadex à l'aide d'un moule spécial
- Ajouter 300µl d'eau ultra-pure dans chaque puit. La plaque Sephadex sera prête après 3h.
- Centrifuger à 1200g/2minutes 4°C en mettant une plaque collective (poubelle) au-dessous de notre plaque de purification pour récupérer les 300µl d'eau. Le Sephadex forme un gel pour la purification des produits de PCR.
- Ajouter 10µl de l'eau distillée dans chaque cupule contenant l'ADN (produits du BigDye), prendre une plaque de récupération propre en respectant l'ajustement des lettres et numéros avec la plaque Sephadex.
- Transférer les 20µl dans la plaque du Sephadex et faire une deuxième centrifugation 1200g/2minutes 4°C.

- Récupérer de l'ADN purifié au Sephadex dans la plaque de récupération qu'on recouvre avec Septa (Caoutchouc perforé) et la déposer sur une autre plaque appropriée au séquenceur.

2.6.6.3 Lecture des résultats

Le séquençage d'ADN a été réalisé à l'aide de l'appareil ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Les résultats obtenus ont été analysés grâce au logiciel CodonCode Aligner 3.7.1.1 sequencing analysis software.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de BlastN dans la base de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) pour la caractérisation.

2.7 Multi-locus sequence typing (MLST)

(Curran *et al.*, 2004)

MLST est une technique de génotypage basée sur le séquençage de 5 à 10 gènes de ménage « house keeping genes », importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps avec un taux de mutation faible et les allèles sont caractéristiques de chaque espèce. Pour *P. aeruginosa*, la technique de MLST a été développée et mise au point par Curran *et al.* en 2004. Elle est basée sur l'analyse par séquençage nucléotidique du polymorphisme de 7 gènes domestiques (Tab.2.6) répartis sur le chromosome bactérien et conservés au cours de l'évolution.

Pour chaque souche bactérienne, la combinaison des allèles obtenus à partir de chaque locus sélectionné permet de définir une séquence type (ST) représentant un génotype multilocus. Ces séquences types et les allèles qu'elles définissent sont consultables dans les bases de données sur PubMed (<http://pubmlst.org>). Cette technique permet également de mettre en évidence les liens phylogénétiques entre les clones.

2.7.1 Extraction de l'ADN

L'ADN chromosomique a été extrait de ces souches purifiées sur un Automate EZ1 avec un kit Qiagen : 51304 Qiamp DNA mini kit (Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

2.7.2 Amplification des 7 gènes

Les sept gènes sélectionnés comme décrit précédemment (Curran *et al.*, 2004) étaient *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, et *trpE* (Tab.2.6).

Tableau 2.6 Amorcres de séquençage pour le typage par MLST de *P. aeruginosa*

Gènes	Amorcres	Séquences	Produits de PCR
<i>acsA</i>	acsA-F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842pb
	acsA-R	GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT	
<i>aroE</i>	aroE-F	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	498pb
	aroE-R	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	
<i>guaA</i>	guaA-F	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940pb
	guaA-R	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	
<i>mutL</i>	mutL-F	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940pb
	mutL-R	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	
<i>nuoD</i>	nuoD-F	ACGGCGAGAACGAGGACTAC	406pb
	nuoD-R	TGGCGGTCTGGTGAAGGTGAA	
<i>ppsA</i>	ppsA-F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989pb
	ppsA-R	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	
<i>trpE</i>	trpE-F	GCGGCCAGGGTCGTGAG	811pb
	trpE-R	CCCGGCGCTTGTGATGGTT	

Le mélange réactionnel (25 µl) utilisé lors de la réaction de PCR était composé de 12,5 µl de Mix Quantitec (Qiagen®), 6,5 µl d'eau ultra-pure, 0,5 µl du Primer (F), 0,5 µl du Primer (R) spécifique de chaque gène et 5 µl de d'ADN extrait. Les conditions d'amplifications ont été les suivantes : 1 cycle de dénaturation de l'ADN bicaténaire pendant 15 min à 95°C puis une seconde étape composée de 35 cycles d'amplification enchaînant une phase de dénaturation de 1min à 94°C, une phase d'hybridation de 50 sec à 55°C et une phase d'élongation 1 min à 72°C, et enfin un cycle final d'élongation de 7 min à 72°C .

2.7.3 Contrôle des produits amplifiés

Les produits d'amplification (10 µl) ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant du BET (Biorad®) dans une solution de TBE 0,5X, pendant 30 minutes sous une tension de 130 V. La taille des produits amplifiés a été visualisée sur la table UV du transilluminateur dans une chambre noir. Le marqueur de taille moléculaire TrackIt™ 100 bp DNA Ladder a été placé à l'extrémité du gel afin de pouvoir analyser la taille des fragments retrouvés.

2.7.4 Séquençage

Le séquençage des produits de PCR, dans les deux directions, a été fait en utilisant le ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) selon les indications du fournisseur (comme cité dans la partie PCR). Le séquençage d'ADN a été réalisé à l'aide de l'appareil ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) selon la méthode de séquençage de SANGER (Sanger *et al.*, 1977). Les résultats obtenus ont été analysés grâce au logiciel CodonCode 3.7.1.1 sequencing analysis software.

2.7.5 Analyse des séquences obtenues

Un numéro d'allèle a été attribué à chaque séquence, puis grâce à la combinaison des 7 numéros d'allèles, un numéro d'une séquence type (ST) a été déterminé pour chaque souche bactérienne selon la base de données MLST ([http:// pubmlst.org/paeruginosa](http://pubmlst.org/paeruginosa)). Les séquences MLST ont été alignées et regroupées grâce aux logiciels CLUSTAL X et MEGA 4.

Chapitre III

Résultats & Discussion

3.1 Répartition des souches identifiées

Deux cent dix-sept (217) souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de 900 prélèvements réalisés au niveau de trois centres hospitalo-universitaires (CHU) du nord-ouest algérien, dont **79** souches ont été isolées au niveau du CHU d'Oran, **66** souches au niveau du CHU de Tlemcen et **72** souches au niveau du CHU de Sidi Bel Abbès.

Sur une période d'étude de quatre ans, allant de janvier 2009 à novembre 2012, les souches de *P. aeruginosa* étaient isolées à partir des services de réanimation (65,90%), les services de chirurgie (15,21%), les services de neurochirurgie (7,83%), les services de traumatologie (5,07%), d'urgences (3,69%), et de médecine interne (2,30%) (Tab.3.7).

Tableau 3.7 Origine et répartition des souches selon les services

	Chirurgie	Médecine Interne	Neurochirurgie	Réanimation	Traumatologie	UMC	Total
2009	14	1	3	28	4		50
Sidi Bel Abbès	5	1		8			14
Tlemcen	9		3	20	4		36
2010	8	4	5	43	4	4	68
Oran			1	29			30
Sidi Bel Abbès	8	4	4	8	4	4	32
Tlemcen				6			6
2011	8		6	53	3	3	73
Oran	2		2	34			38
Sidi Bel Abbès	4			6	3	3	16
Tlemcen	2		4	13			19
2012	3		3	19		1	26
Oran	1		1	9			11
Sidi Bel Abbès	2		1	6		1	10
Tlemcen			1	4			5
Total	33	5	17	143	11	8	217

UMC: Urgence médicale chirurgicale.

Ces souches ont été isolées à partir de différents prélèvements pathologiques, comprenant les aspirations trachéales (49,31%), les plaies (29,95%), les sondes urinaires (9,68%) et les sondes gastriques (0,92%) de patients hospitalisés dans différentes unités des trois hôpitaux (Tab.3.8).

Des prélèvements provenant de sites de l'environnement hospitalier (10,14%) ont été collectés dans la même période d'étude au niveau de ces services.

Tableau 3.8 Origine et répartition des souches selon les sites de prélèvement

	Patients				Environnement*	Total
	Aspiration trachéale	Plaie	Sonde gastrique	Sonde urinaire		
2009	22	22		6		50
Sidi Bel Abbes	3	7		4		14
Tlemcen	19	15		2		36
2010	29	21	1	2	15	68
Oran	22	2	1		5	30
Sidi Bel Abbes	2	19		1	10	32
Tlemcen	5			1		6
2011	45	14		9	5	73
Oran	36	1		1		38
Sidi Bel Abbes	4	9		3		16
Tlemcen	5	4		5	5	19
2012	11	8	1	4	2	26
Oran	7	2		2		11
Sidi Bel Abbes	2	5	1		2	10
Tlemcen	2	1		2		5
Total	107	65	2	21	22	217

*Environnement : poignée de porte, bord de lits, matériel médical, lave mains.

3.2 Sensibilité aux antibiotiques

Les souches de *P. aeruginosa* ont montré différents niveaux de résistance vis-à-vis des antibiotiques, mis à part la colistine, à laquelle tous les isolats étaient sensibles (Tab.3.9).

Les niveaux de résistance étaient nettement plus élevés au niveau de l'hôpital d'Oran (Fig.3.3), avec des taux de résistance de 32,9% à l'Imipénème, 51,9% à la Ticarcilline, 60,8% à la Ticarcilline+ ac.clavulanique, 24,1% à la Pipéracilline, 36,7% à la Pipéracilline+ tazobactam, 38% à la Ceftazidime et 17,7% à l'Aztréonam. Les taux de résistance aux aminosides sont respectivement: Gentamicine (34,2%), Tobramycine (30,4%) et Amikacine (7,6%). Pour les fluoroquinolones, un taux de résistance important a été observé pour la Ciprofloxacine (41,8%).



Figure 3.3 AntibioGrammes de deux souches de *P. aeruginosa* multiresistantes aux antibiotiques isolées au CHU d'Oran.

Contrairement à la résistance aux antibiotiques des souches isolées au niveau de l'hôpital d'Oran, les bacilles pyocyaniques ont montré une bonne sensibilité aux antibiotiques testés au niveau de l'hôpital de Tlemcen et de l'hôpital de Sidi Bel Abbes. En effet, la ticarcilline et la ticarcilline+ ac.clavulanique ont été les plus touchés puisque sont observés des taux de résistance de 18,1% et 43,1% respectivement pour le CHU Sidi Bel Abbes, 25,8% et 34,8% respectivement pour le CHU de Tlemcen. Pour l'imipénème, les résultats révèlent un taux de résistance de 12,5% au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes (Tab.3.9).

Tableau 3.9 Taux de résistance aux antibiotiques

		TIC	TCC	CAZ	IMP	ATM	PIP	TZP	AN	GM	TM	CIP	CS
Oran	S	36 45,57%	31 39,24%	47 59,49%	50 63,29%	39 49,37%	59 74,68%	49 62,03%	61 77,22%	50 63,29%	54 68,35%	44 55,7%	79 100%
	I	2 2,53%	0 0	2 2,53%	3 3,8%	26 32,91%	1 1,27%	1 1,27%	12 15,19%	2 2,53%	1 1,27%	2 2,53%	0 0
	R	41 51,9%	48 60,8%	30 38%	26 32,9%	14 17,7%	19 24,1%	29 36,7%	6 7,6%	27 34,2%	24 30,4%	33 41,8%	0 0
Sidi Bel Abbes	S	59 81,94%	41 56,94%	72 100%	62 86,11%	58 80,56%	71 98,61%	71 98,61%	66 91,67%	72 100%	71 98,61%	66 91,67%	72 100%
	I	0 0	0 0	0 0	1 1,39%	14 19,44%	0 0	0 0	4 5,56%	0 0	0 0	2 2,78%	0 0
	R	13 18,1%	31 43,1%	0 0	9 12,5%	0 0	1 1,4%	1 1,4%	2 2,8%	0 0	1 1,4%	4 5,6%	0 0
Tlemcen	S	47 71,21%	41 62,12%	64 96,97%	62 93,94%	46 69,7%	64 96,97%	65 98,48%	62 93,94%	64 96,97%	64 96,97%	59 89,39%	66 100%
	I	2 3,03%	2 3,03%	0 0	0 0	19 28,79%	1 1,52%	0 0	4 6,06%	1 1,52%	0 0	2 3,03%	0 0
	R	17 25,8%	23 34,8%	2 3%	4 6,1%	1 1,5%	1 1,5%	1 1,5%	0 0	1 1,5%	2 3%	5 7,6%	0 0
Total	S	142 65,44%	113 52,07%	183 84,33%	174 80,18%	143 65,9%	194 89,4%	185 85,25%	189 87,1%	186 85,71%	189 87,1%	169 77,88%	217 100%
	I	4 1,84%	2 0,92%	2 0,92%	4 1,84%	59 27,19%	2 0,92%	1 0,46%	20 9,22%	3 1,38%	1 0,46%	6 2,76%	0 0
	R	71 32,7%	102 47%	32 14,7%	39 18%	15 6,9%	21 9,7%	31 14,3%	8 3,7%	28 12,9%	27 12,4%	42 19,4%	0 0

S :sensible, I : intermédiaire, R : résistant

TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline/ac.clavulanique, CAZ: ceftazidime, IMP: imipénème, ATM: aztréonam, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline /tazobactam, AN : amikacine, GM : gentamicine, TM : tobramycine, CIP : ciprofloxacine, CS : colistine.

3.3 Phénotypes de résistance aux antibiotiques

L'analyse des phénotypes de résistance des isolats de *P. aeruginosa* révèle certaines particularités épidémiologiques (Fig.3.5 ; Tab. 3.10).

Le phénotype sauvage regroupant les souches n'ayant acquies aucune résistance aux antibiotiques, représente le phénotype majoritaire au sein des trois CHU inclus dans notre étude avec 59,45% du total des souches.

Le phénotype de résistance à l'imipénème vient en seconde position avec 18,43% de souches présentant le phénotype « porine OprD déficiente », seul, ou associé à d'autres mécanismes de résistances aux β -lactamines, ainsi que deux souches productrices de métallo- β -lactamases selon le résultat positif au test d'EDTA (Fig. 3.4) isolées au niveau du CHU d'Oran.

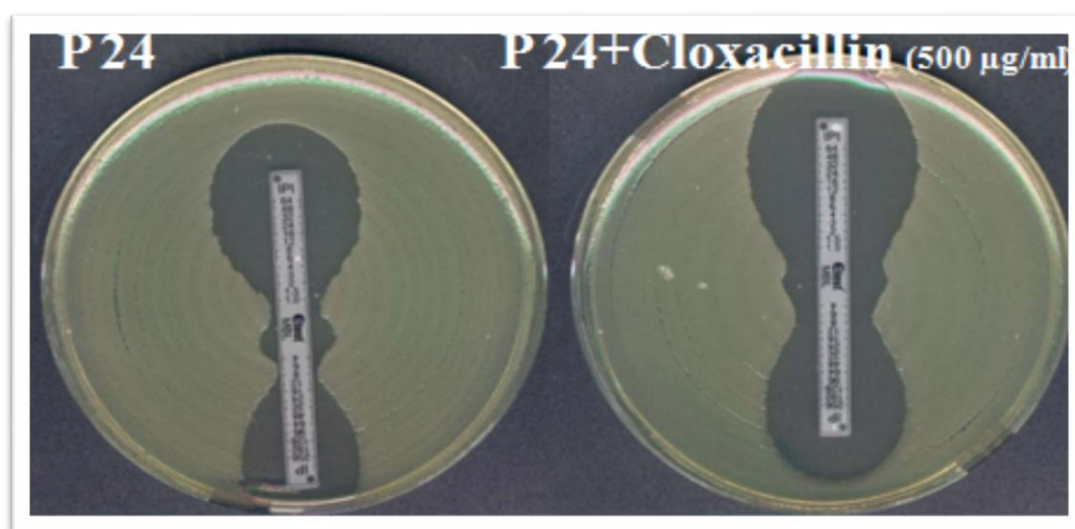


Figure 3.4 E-test : résultat positif pour l'EDTA

Le phénotype d'efflux vient en troisième position, avec 17,97% des souches, en proportion presque égale au sein des trois hôpitaux, suivi par l'hyperproduction de céphalosporinases présente chez 14,28% des souches, seule (4,61%) ou associée au phénotype « porine OprD déficiente » (9,67%). L'association entre ces deux phénotypes a été retrouvée exclusivement au sein des souches isolées au niveau de l'hôpital d'Oran. Cette hyperproduction de céphalosporinases a été confirmée par la restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ième} génération sur gélose Mueller-Hinton additionnée d'une concentration définie de cloxacilline.

Tableau 3.10 Répartition des phénotypes de résistance selon les services

Services et Villes	CASE	CASE+OprD ⁻	Efflux	Efflux+ OprD ⁻	OprD ⁻	Sauvage	PASE+ OprD ⁻	MβL	Total
Oran	8	21	10		1	35	2	2	79
Chirurgie						3			3
Neurochirurgie						3		1	4
Réanimation	8	21	10		1	29	2	1	72
Sidi Bel Abbas			13		10	49			72
Chirurgie			3		1	15			19
Médecine interne			1			4			5
Neurochirurgie			1			4			5
Réanimation			4		9	15			28
Traumatologie			3			4			7
UMC			1			7			8
Tlemcen	2		15	1	3	45			66
Chirurgie			2			9			11
Neurochirurgie			2		1	5			8
Réanimation	1		10	1	2	29			43
Traumatologie	1		1			2			4
Total	10	21	38	1	14	129	2	2	217

CASE: céphalosporinase hyperproduite, PASE: pénicillinase, OprD⁻: porine OprD déficiente ; MβL: Métallo-β-Lactamase.

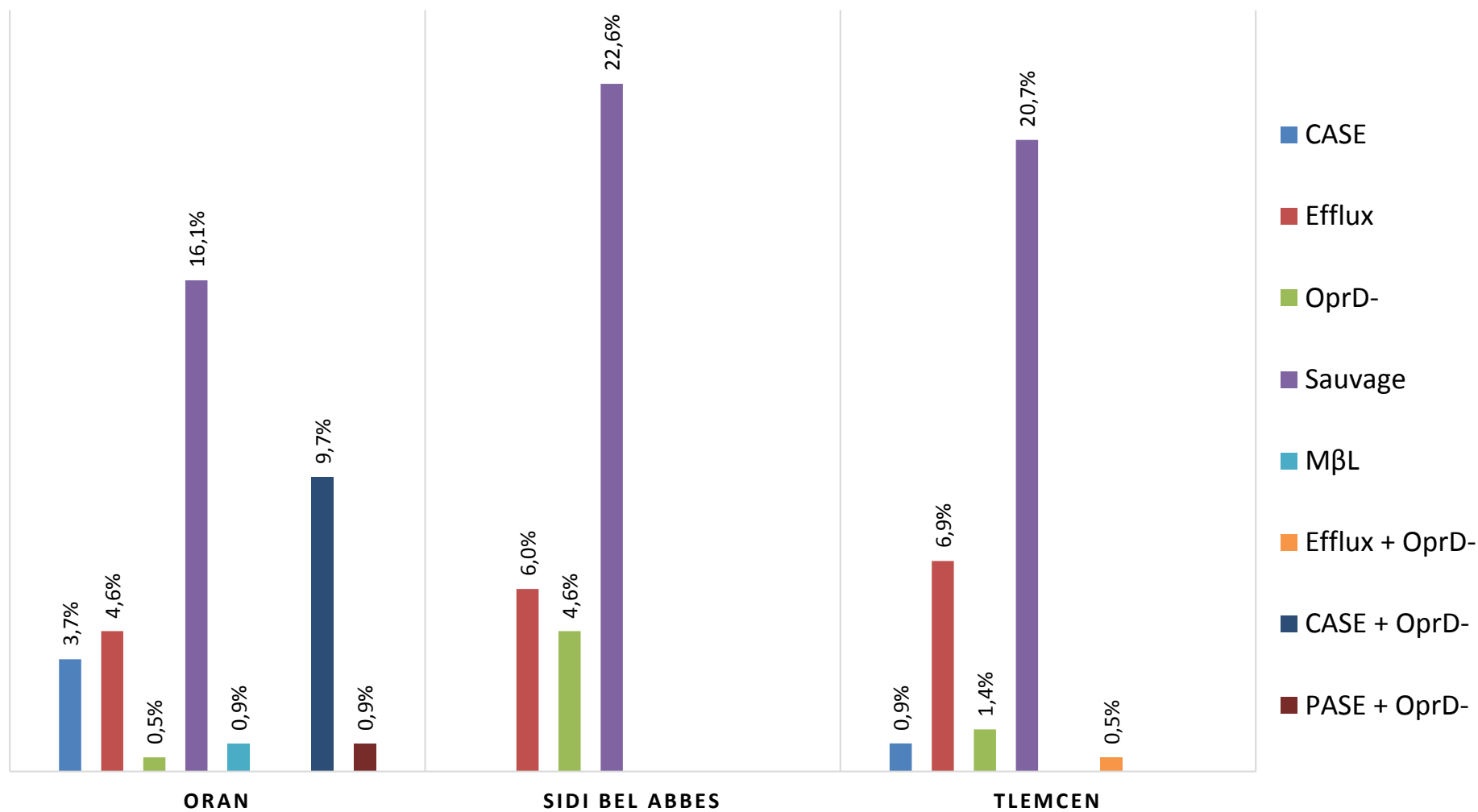


Figure 3.5 Répartition des phénotypes de résistance selon les hôpitaux.

3.4 Identification des gènes de résistance aux antibiotiques

Sur les 217 souches étudiées, 89 souches cliniques de *P. aeruginosa* ont été sélectionnées sur la base de leurs phénotypes de résistance pour l'analyse moléculaire.

3.4.1 Résistance enzymatique

Pour les souches résistantes aux β -lactamines, des PCR ont été réalisées pour la recherche de gènes codant les β -lactamases suivantes : SHV, TEM, PER, VEB.

Seul le gène *bla*_{TEM} a pu être identifié chez trois souches (Fig.3.6). Les résultats étaient négatifs pour les autres PCR effectuées.

Le séquençage a permis d'identifier le gène *bla*_{TEM-1} chez deux souches et le gène *bla*_{TEM-110} chez la troisième souche.

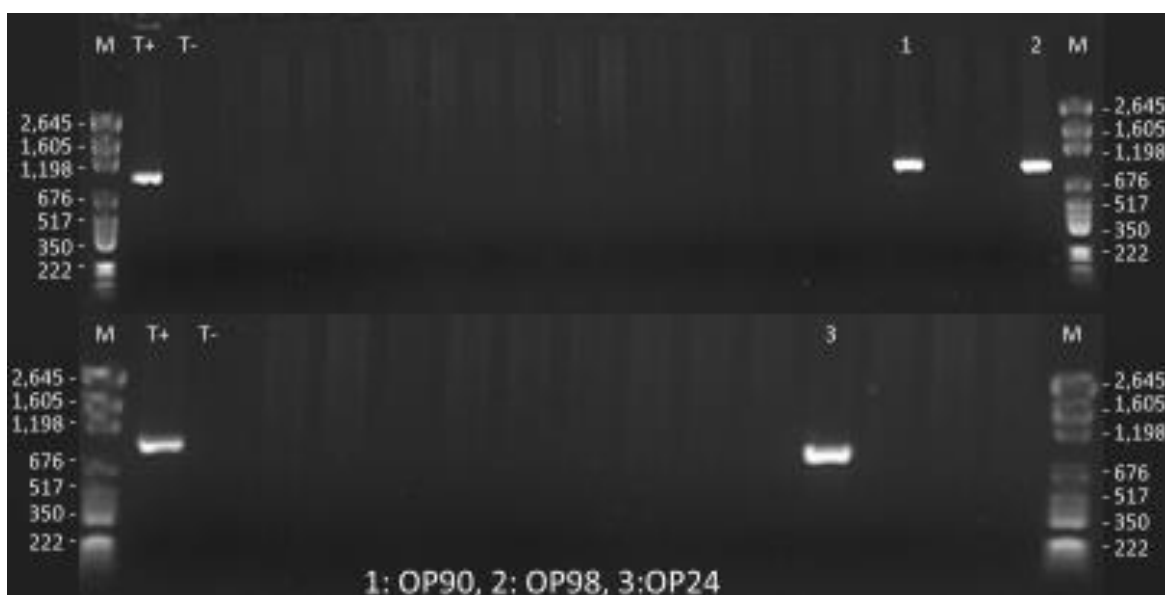


Figure 3.6 Résultats de la PCR *bla*_{TEM}

La recherche de gènes codant des métallob- β -lactamases VIM, IMP, NDM, a été réalisée sur 35 souches résistantes à l'imipénème. Le gène *bla*_{VIM-2} a été identifié chez 2 souches (Fig.3.7) isolées à partir du CHU d'Oran qui présentaient un résultat positif pour le test d'EDTA (Fig.3.4).

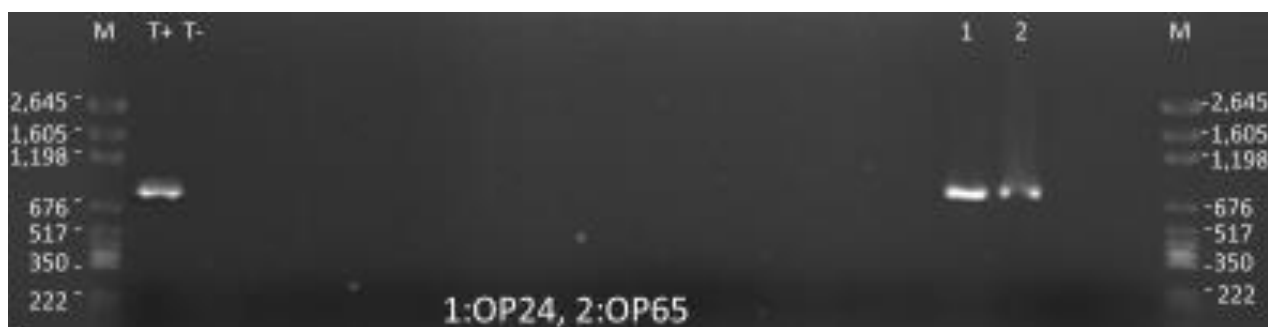


Figure 3.7 Résultats de la PCR *bla_{VIM}*

En ce qui concerne la résistance aux aminosides, trois souches présentaient le gène *aac(3')-II* (Fig.3.8) dont l'une produisait également une métallo- β -lactamase de type VIM-2.

La PCR effectuée pour le gène *aac(6')* s'est avérée négative.

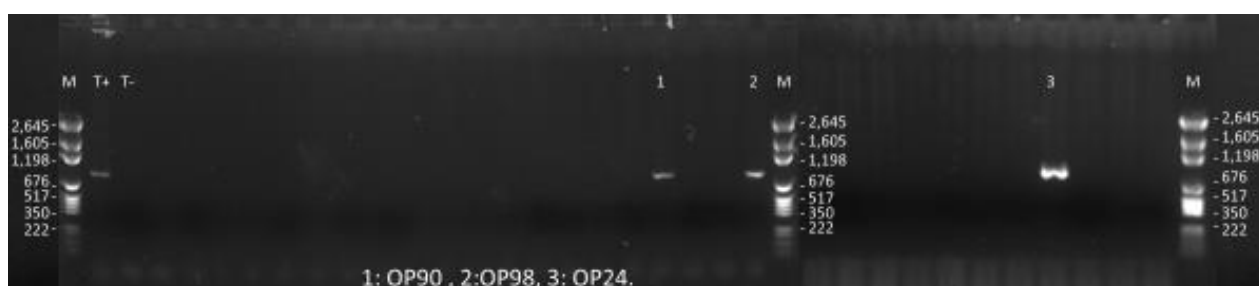
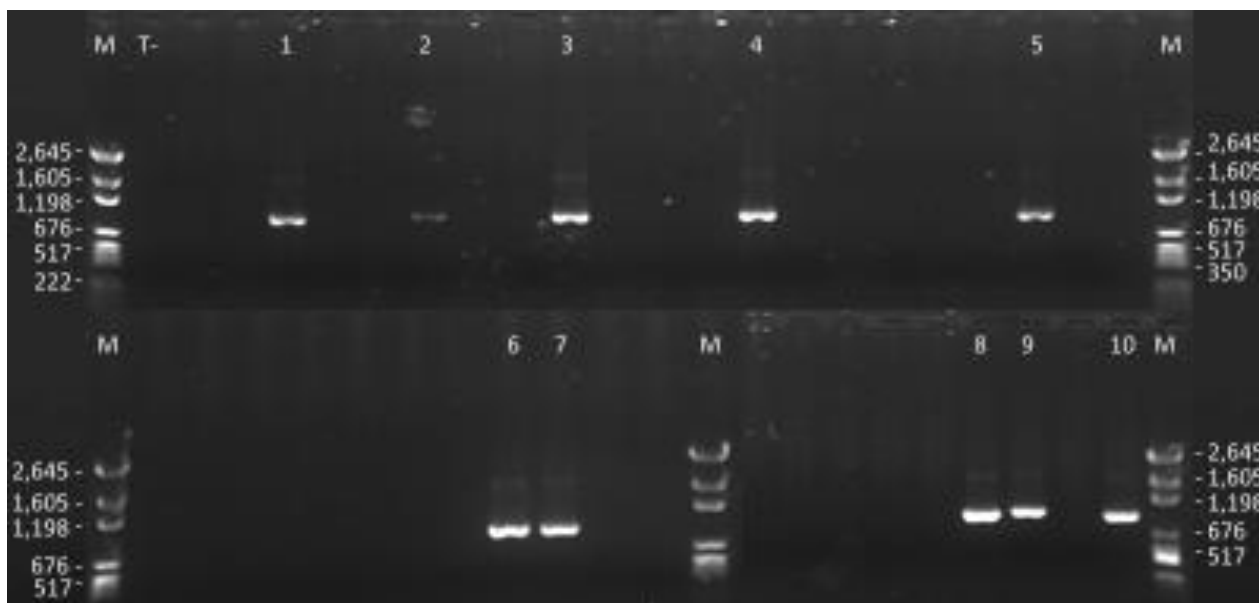


Figure 3.8 Résultats de la PCR *aac(3')-II*

Le gène *aad-A* a été identifié chez 10 souches (Fig.3.9). Six souches contenaient le gène *aadA13* tandis que les autres exprimaient le gène *aadA1* dont deux produisaient simultanément une VIM-2 et deux autres souches produisaient une TEM-1 pour l'une et une TEM-110 pour l'autre.



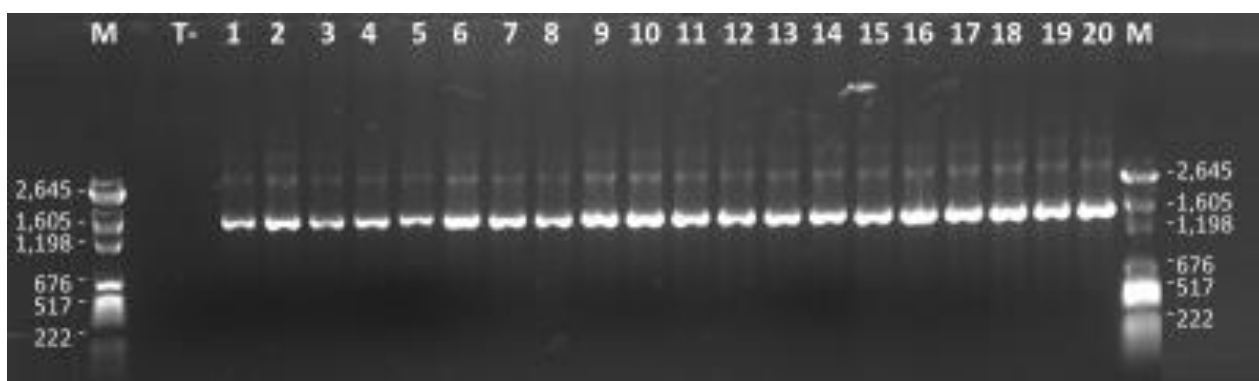
1 : OP74. 2 : OP24. 3 :OP65 . 4 : OP75. 5 : OP23. 6: OP43. 7: OP98. 8: OP51. 9: OP90. 10: OP49

Figure 3.9 Résultats de la PCR *aad-A*

3.4.2 Résistance non enzymatique

Parmi les 217 souches de *P. aeruginosa* isolées dans cette étude, 39 (18%) souches étaient résistantes à l'imipénème avec une CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$. 26 souches (12%) étaient isolées de l'hôpital d'Oran, 9 (4,15%) de l'hôpital de Sidi Bel Abbas et 4 (1,85%) de l'hôpital de Tlemcen.

Des PCR *oprD* ont été réalisées sur 35 souches résistantes à l'imipénème ainsi que 18 souches sensibles (Fig.3.10).



1: OP81, 2: OP98, 3: OP51, 4: P355, 5: OP90, 6: OP67, 7: OP79, 8: OP89, 9: OP74, 10: OP16, 11: OP61, 12: OP49, 13: OP71, 14: OP33, 15: OP87, 16: OP84, 17: OP107, 18: OP85, 19: OP23, 20: OP59

Figure 3.10 Résultats de la PCR *oprD*

Les produits de PCR ont été entièrement séquencés comme décrit ci-dessus, et les séquences résultantes ont été comparées à la séquence *oprD* de la souche de référence PAO1 (GenBank accession no. CAA78448).

Différents points de mutations ont été observés dans les séquences du gène *oprD* chez toutes les souches résistantes à l'imipénème comparées à la séquence *oprD* de PAO1 (Fig.3.11). Aucune mutation n'a été observée dans la séquence *oprD* des souches sensibles à l'imipénème.

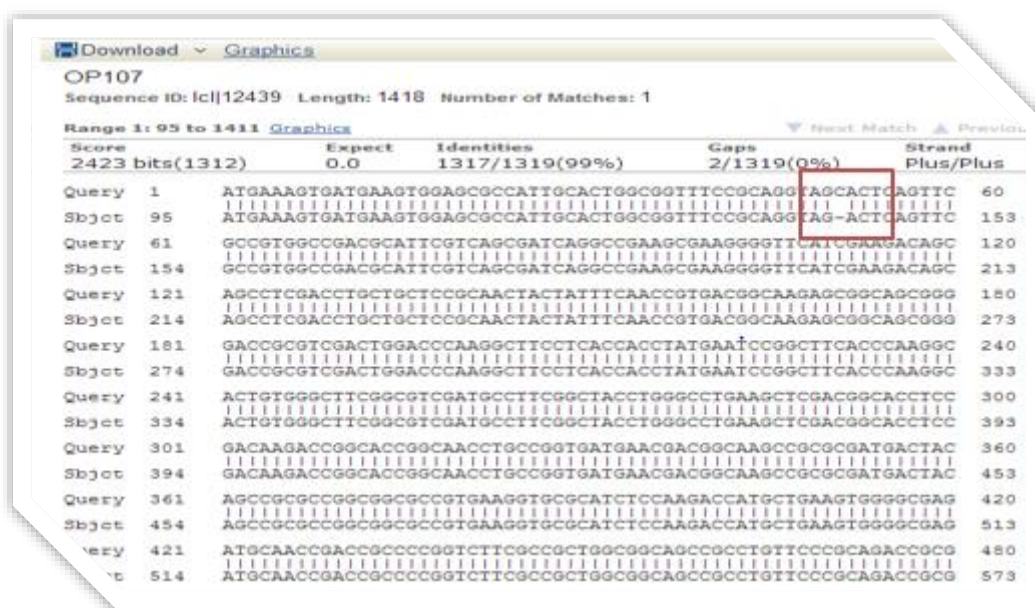


Figure 3.11 Comparaison de la séquence *oprD* de la souche OP107 avec PAO1

Après traduction des séquences *oprD* des souches résistantes à l'imipénème en protéines, des codons stop ont été retrouvés dans différentes parties des gènes, ce qui indique que ces souches avaient une protéine OprD altérée (Fig.3.12).



Figure 3.12 Traduction de la séquence *oprD* des souches OP107 et PAO1 en protéines

En se basant sur les points de mutation, les souches résistantes à l'imipénème peuvent être classées en sept groupes (Tab.3.11). Le premier Groupe « G1 » regroupe dix-sept isolats du CHU d'Oran et présente une délétion du C₅₁ (Fig.3.11) résultant en un codon stop TGA₉₄ (le nombre indique la position du premier codon stop par rapport à la position des acides aminés).

Pour les six autres groupes, plusieurs types de mutation (substitution, insertion et délétion) ont conduit à des codons stop et ont été retrouvés dans dix-huit souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des trois hôpitaux, incluant G2 (TGA₃₄₅), G3 (TGA₁₀₇), G4 (TGA₆₅), G5 (TGA₃₇₉), G6 (TGA₁₆₉), et le G7 (TGA₁₉₅) (Tab.3.11; Fig.3.14).

Tableau 3.11 Répartition des différents Groupes OprD au sein des trois hôpitaux

	Groupe OprD	Nombre de souches	Position du Codon Stop**
Oran	G1	17	TGA ₉₄
	G2*	7	TGA ₃₄₅
	G5	2	TGA ₃₇₉
	G6*	1	TGA ₁₆₉
Tlemcen	G3	1	TGA ₁₀₇
	G4	2	TGA ₆₅
Sidi Bel Abbès	G3	4	TGA ₁₀₇
	G7	1	TGA ₁₉₅

**Position du premier codon stop par rapport à la position des acides aminés.

*Une souche appartenant à ce groupe produit également une VIM-2.

3.5 Typage moléculaire

Le typage moléculaire par MLST (Multi-Locus Sequence Typing) a été réalisé sur 53 souches dont 35 souches résistantes à l'imipénème et 18 souches sensibles à l'imipénème. Les sept gènes utilisés dans l'analyse MLST, *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* et *trpE* ont été amplifiés (Fig.3.13) et séquencés chez les 53 souches comme décrit ci-dessus.

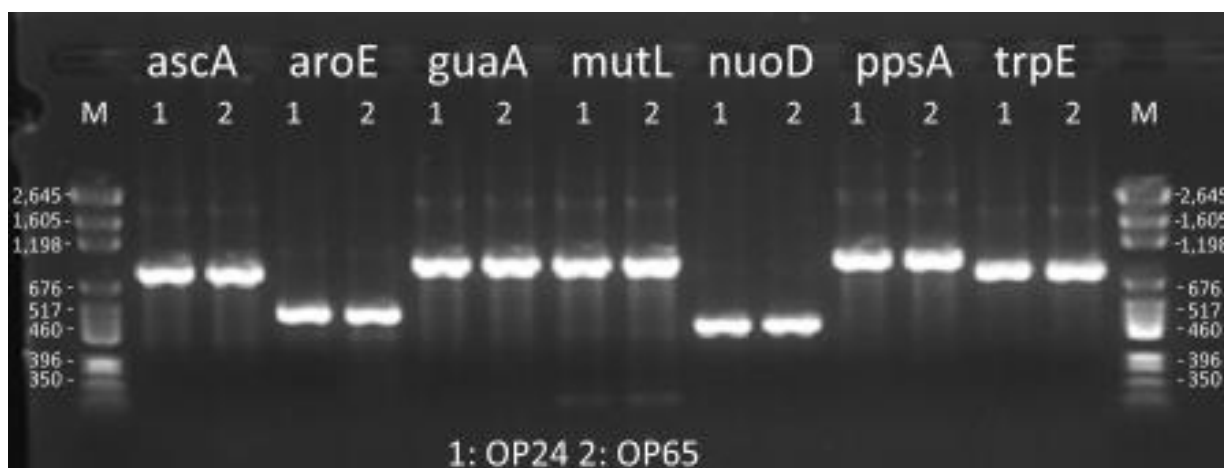


Figure 3.13 Résultats de la PCR MLST

Un total de 23 Séquences Types (ST) a été attribué aux 53 souches de *P. aeruginosa* étudiées en fonction des profils alléliques disponibles dans la base de données MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) puis alignées et regroupées en arbre phylogénétique en utilisant CLUSTAL X et MEGA 4 (Fig.3.14).

Cinq clones ont été identifiés parmi les souches résistantes à l'imipénème. Ces différents clones ont été regroupés par rapport aux groupes OprD comme suit : ST244, ST622 et ST1076 isolés à partir de l'hôpital d'Oran et appartenant au groupe OprD; G1 (TGA₉₄), G2 (TGA₃₄₅), et G5 (TGA₃₇₉) respectivement ($p < 10^{-6}$); ST313 isolé de l'hôpital de Sidi Bel Abbes et correspondant au G3 (TGA₁₀₇) ($p < 10^{-6}$) et ST1295 isolé de l'hôpital de Tlemcen et appartenant au G4 (TGA₆₅) ($p < 10^{-6}$).

Ces groupes clonaux ont été isolés à partir des unités de soins intensifs pour les trois différents hôpitaux. L'analyse MLST a révélé 2 différentes séquences type pour les deux souches productrices de MBL VIM-2, isolées à partir d'Oran: ST1406 appartenant au groupe OprD G2 (TGA₃₄₅) et ST343 appartenant au groupe OprD G6 (TGA₁₆₉).

Sur les dix-huit souches sensibles à l'imipénème étudiées, deux autres clones incluant six souches (ST381 et ST538) ont été détectés (Fig.3.14), les douze autres isolats ayant montré douze ST différents: 386, 1093, 490, 1433, 1226, 557, 1341, 493, 1175, 464, 796, et 803.

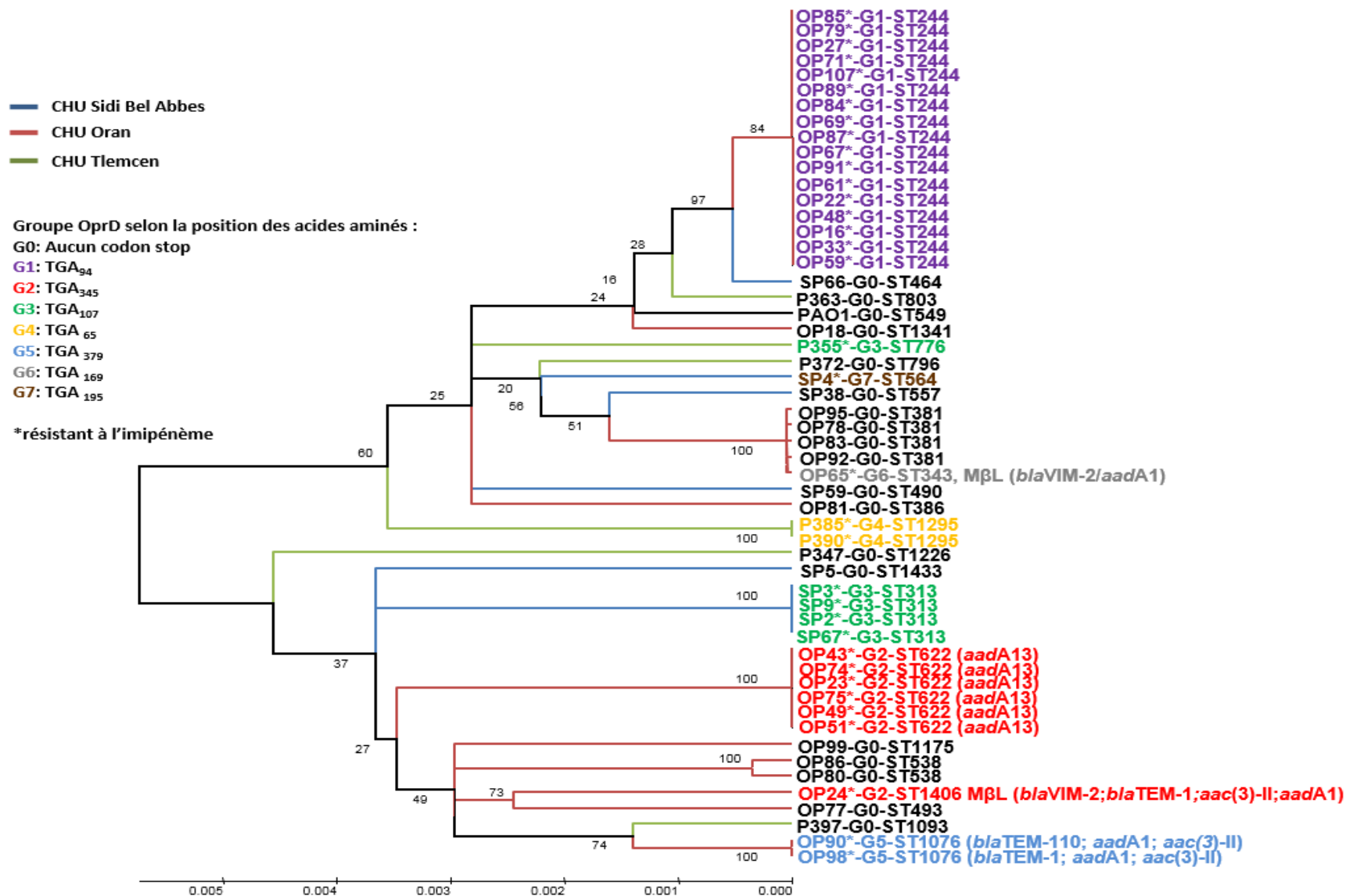


Figure 3.14 Arbre phylogénétique basé sur les séquences MLST de 53 souches de *P. aeruginosa* alignée avec la souche PAO1

3.6 Discussion

La présente étude a permis d'évaluer la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* au niveau des hôpitaux du nord-ouest algérien durant 4 ans, période d'étude allant de 2009 à 2012.

En effet, *P. aeruginosa* est l'un des principaux agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales (Lister *et al.*, 2009), avec un réservoir essentiellement hospitalier et une capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance. Ces infections sont très favorisées par la mise en place de matériels invasifs comme les sondes vésicales pour les infections urinaires, les cathéters intravasculaires pour les bactériémies et les sondes d'intubation pour les pneumopathies nosocomiales chez les patients ventilés mécaniquement. Ces dispositifs altèrent les défenses naturelles de l'organisme et créent une brèche qui favorise la contamination de milieux normalement stériles.

La fréquence d'isolement ainsi que les taux de résistance aux antibiotiques diffèrent selon l'origine et le type du prélèvement. Conformément aux études de surveillance antérieures (Hanberger *et al.*, 1999; Obritsch *et al.*, 2004; Flamm *et al.*, 2004), les prélèvements d'origine respiratoire réalisés dans les services de soins intensifs sont le principal site d'isolement des souches de *P. aeruginosa* et représentent les taux les plus importants de résistance vis-à-vis des β -lactamines, des aminosides et des fluoroquinolones testés dans notre étude. Ceci peut parfaitement s'expliquer par la fréquence et l'importance des colonisations à *P. aeruginosa* dans le tractus respiratoire et la forte pression antibiotiques exercée chez ces patients hospitalisés dans les services de soins intensifs Algériens.

La résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques pose un grand problème au niveau des hôpitaux du nord-ouest algérien (Drissi *et al.*, 2008; Drissi *et al.*, 2010; Baba Ahmed-Kazi *et al.*, 2013; Berrazeg *et al.*, 2013; Mesli *et al.*, 2013). Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance élevé de *P. aeruginosa* aux différentes classes d'antibiotiques testées ainsi que la diversité de phénotypes de résistance au niveau de l'hôpital d'Oran par-rapport à ceux observés à l'hôpital de Tlemcen et à l'hôpital de Sidi Bel Abbes. Ceci peut être dû au nombre plus important de lits dans cet hôpital par rapport au deux autres CHU, sans oublier qu'il accueille beaucoup de patients provenant de différentes villes de l'ouest algérien. Les souches isolées au niveau du CHU d'Oran présentaient des taux de résistance élevés aux β -lactamines. Les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime (32,9% et 38% respectivement) sont beaucoup plus élevés par rapport à ceux rapportés dans le dernier

rapport du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques au CHU d'Oran (<http://www.sante.dz/aarn/rapports.htm>) où les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime étaient de 3,73% et 16,15% respectivement.

Si l'on considère l'ensemble des souches isolées dans notre étude, les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime (18% et 14,7% respectivement) concordent avec ceux habituellement observés dans les pays européens, qui en 2012 étaient de 17,1% à l'imipénème et de 13,5% à la ceftazidime (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>) et différent légèrement du dernier rapport du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques (<http://www.sante.dz/aarn/rapports.htm>) où le taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime était de 14,10% et 18,09% respectivement.

A l'hôpital de Tlemcen et de Sidi Bel Abbes, les taux de résistance sont très inférieurs par rapport à l'hôpital d'Oran sauf pour la ticarcilline, seule ou additionnée à l'acide clavulanique, probablement dus à une surproduction des systèmes d'efflux actif MexAB-OprM (Hocquet *et al.*, 2007; Boutoille *et al.*, 2009), puisque ces souches étaient de sensibilité intermédiaire ou résistante à l'aztréonam. Dans notre étude ce phénotype est représenté par 22,73% des souches isolées au CHU de Tlemcen, ce qui concorde avec le résultat de Drissi *et al.* avec 24% de surproduction de systèmes d'efflux actifs MexAB-OprM (Drissi *et al.*, 2008).

La résistance enzymatique liée à la production d'une β -lactamase acquise de type pénicillinase TEM-110 n'a été détectée que chez une seule souche isolée à l'hôpital d'Oran bien-que ce gène a été rapporté comme épidémique entre 2005 et 2007 à l'hôpital de Tlemcen (Drissi *et al.*, 2008), toutefois, nous avons noté que le taux de résistance à l'imipénème a considérablement diminué (6,1%) au CHU de Tlemcen dans notre étude par rapport à l'étude précédente menée par Drissi et ses collaborateurs (35%). L'hôpital de Sidi Bel Abbes demeure en seconde position après le CHU d'Oran avec un taux de résistance de 12,5% à l'imipénème.

Dans cette étude, trente-neuf souches (18%) isolées à partir de trois différents hôpitaux étaient résistantes à l'imipénème, soit vingt-six souches (32,9%) isolées de l'hôpital d'Oran dont deux souches productrices de MBL VIM-2. De nombreuses études ont rapporté la prédominance du gène VIM-2 chez les souches de *P. aeruginosa* dans le bassin méditerranéen (Cornaglia *et al.*, 2011) (Fig.1.2), tandis qu'en Afrique du nord, la présence

de VIM-2 n'a été rapportée que récemment en Tunisie (Hammami *et al.*, 2010; Hammami *et al.*, 2011). Au Maroc, une étude rapporte que 27% des souches de *P. aeruginosa* étaient productrices de MBLs sans spécifier leur type (Ait El Kadi *et al.*, 2006). VIM-19 a été la première carbapénèmase identifiée en Algérie à partir de cinq isolats cliniques d'entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Providencia stuartii*) (Robin *et al.*, 2010). Récemment, Touati *et al.* ont décrit la première diffusion de souches de *P. aeruginosa* productrices de MBL VIM-2 dans 14 isolats cliniques au niveau de Annaba, au nord-est algérien (Touati *et al.*, 2013). Ce résultat a coïncidé avec la période de notre étude. Ainsi, cette étude représente la deuxième description de *P. aeruginosa* productrices de VIM-2 en Algérie au cours de la même année. Cette constatation peut refléter la répartition actuelle de MBLs dans les bactéries à Gram négatif cliniquement pertinentes dans l'Afrique du nord. En l'absence de MBLs, l'inactivation mutationnelle du gène *oprD* est le principal déterminant de la résistance aux carbapénèmes, en particulier à l'imipénème, chez les souches de *P. aeruginosa* (Pirnay *et al.*, 2002b). L'analyse des séquences des gènes *oprD* des souches résistantes à l'imipénème, dont 33 souches non-productrices de MBLs et les deux souches productrices de VIM-2, a révélé divers points de mutation, comprennent la délétion d'un seul nucléotide résultant en un codon stop prématuré (Groupe 1) ou de plusieurs types de mutation (substitution, insertion, et délétion) résultant en un codon stop pour les six autres groupes. En revanche, les gènes *oprD* de dix-huit isolats sensibles à l'imipénème n'ont montré aucune mutation dans la séquence du gène *oprD*. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont rapporté l'absence de mutation dans la séquence *oprD*, pouvant causer la perte de fonction de la protéine OprD, chez les souches de *P. aeruginosa* sensible à l'imipénème (Lee et Ko, 2012).

Cette étude est la première à décrire des souches co-exprimant une VIM-2 et la perte de la fonction de la porine OprD chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa*.

Ces résultats indiquent que l'inactivation mutationnelle du gène *oprD* était le principal mécanisme de résistance à l'imipénème chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, comme décrit précédemment dans de nombreuses études (Li *et al.*, 2012; Lee et Ko, 2012).

L'analyse génotypique par MLST des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème au sein des trois hôpitaux du nord-ouest algérien, a montré une grande diversité. Neuf ST ont été identifiés parmi 35 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, et cinq

clones distincts ont été détectés, trois clones à l'hôpital d'Oran, un clone à l'hôpital de Sidi Bel Abbes, et un clone à l'hôpital de Tlemcen.

Les ST retrouvés dans notre étude ne correspondaient pas à ceux cités dans l'étude réalisée à Annaba, où le clone épidémique appartenait au ST1420 (Touati *et al.*, 2013). Le clone appartenant au ST244 (appartenant au complexe clonal CC244) était le plus retrouvé dans notre étude et correspond à un clone international à haut risque (Lee *et al.*, 2011; Vatcheva-Dobrevska *et al.*, 2013). ST244 correspond au second clone majoritaire de *P. aeruginosa* retrouvé en Méditerranée selon une étude menée dans cinq pays (Maatallah *et al.*, 2011).

Les membres appartenant au même clone présentaient une séquence du gène *oprD* identique, illustrant la stabilité de ces complexes clonaux comme démontré précédemment dans l'étude de Pirnay et al (Pirnay *et al.*, 2002a).

Notre étude a démontré que les populations épidémiques étaient d'origine nosocomiale, ils ont été retrouvés exclusivement dans les unités de soins intensifs, en revanche, les deux souches productrices de MBL présentaient deux différents ST, ce qui nous amène à suggérer leur origine communautaire.

Diverses méthodes ont été utilisées pour le typage épidémiologique des souches de *P. aeruginosa*, comprenant les techniques de typage basées sur la PCR, comme ERIC-PCR, ou des techniques plus discriminatoires, telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et la MLST. La technique MLST est basée sur les différences alléliques entre les gènes de ménage, et l'analyse de ces gènes fournit une impression plus réaliste de l'effet de la recombinaison (Pirnay *et al.*, 2002a). Pirnay et ses collaborateurs ont démontré que la résistance aux carbapénèmes liée aux OprD est principalement réalisée par des mutations ponctuelles. Ils ont analysé les séquences *oprI*, *oprL*, et *oprD* et ont conclu que la séquence *oprD* peut être utilisée pour détecter une population épidémique à *P. aeruginosa* (Pirnay *et al.*, 2002a), mais ils n'ont pas réalisé une MLST. L'analyse de la séquence *oprD* dans des souches résistantes à l'imipénème a été réalisée avec succès en tant qu'outil de biotypage dans notre étude. Une corrélation a été observée entre la Séquence Type (ST) et la séquence *oprD* chez les membres appartenant au même clone de *P. aeruginosa*. Cette corrélation entre les deux types d'analyse a été démontrée dans la figure 3.14.

La résistance croisée à plusieurs classes d'antibiotiques est très fréquente dans notre étude, ce qui complique la prise en charge thérapeutique. Le haut niveau de résistance à la ciprofloxacine (CMI=64µg/ml) au niveau de l'hôpital d'Oran est probablement en relation

avec l'usage abusif de cette molécule au cours de la période de notre étude. Cette constatation peut relever la corrélation entre l'utilisation des fluoroquinolones et l'apparition de résistance (Neuhauser *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que l'utilisation extensive de l'imipénème ou de la ciprofloxacine dans les unités de soins intensifs peut conduire à l'émergence de souches résistantes à l'imipénème et à la ciprofloxacine chez les souches de *P. aeruginosa* et que la politique de prescription d'antibiotiques a un impact significatif sur les taux de résistance *P. aeruginosa* dans les unités de soins intensifs (Kallel *et al.*, 2008). Le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est attribuable à l'association des surproductions de pompes à efflux et des mutations dans les gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Nakajima *et al.*, 2002).

De même, la résistance aux aminosides testées dans cette étude semble poser un grand problème à l'hôpital d'Oran, où ces souches résistaient non seulement aux aminosides mais aussi à plusieurs β -lactamines et à la ciprofloxacine, en particulier ceux appartenant au clone représenté par le ST244. On a pu détecter la présence du gène *aac(3')-II* ainsi que les gènes *aad-A1* et *aad-A13* responsables de la résistance aux aminosides dans quelques isolats. D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés dans la même période d'étude à l'est algérien. Les gènes *aadB* et *aacA4* ont été identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase VIM-2 (Touati *et al.*, 2013).

Bien que l'enzyme AAC(6')-Ib n'ait pas été détectée dans les isolats de cette étude, elle semble être l'enzyme la plus répandue dans d'autres études (Shahid et Malik, 2005). Miller *et al.* ont effectué une étude sur plusieurs pays européens et ont rapporté la prédominance du gène *aac(6')-II* suivi du gène *ant(2'')-I* (Miller *et al.*, 1997). Une étude en Turquie a rapporté que le mécanisme majeur de résistance aux aminosides chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* était l'imperméabilité (66,6%), suivi par l'ANT(2'')-I (40%), AAC(6')-II (29,3%), AAC(6')-III (19,3%) et l'AAC(3)-I (16,6%) (Over *et al.*, 2001).

La différence dans la distribution des enzymes AMEs peut résulter de différences entre les profils de prescription d'aminoglycosides, la sélection de la population bactérienne ou des différences géographiques, en l'occurrence des gènes de résistance aux aminoglycosides (Vaziri *et al.*, 2011).

L'absence de ces gènes de résistance chez la majorité des souches dans cette étude suggère la présence de mécanismes de résistance aux aminosides autre que les AMEs.

Au cours de notre étude, aucune souche résistante à la colistine n'a été isolée. Par ailleurs, l'augmentation de l'usage de cette molécule dans le traitement des infections à souches multirésistantes de *P. aeruginosa* serait à l'origine de l'apparition de résistances (Landman *et al.*, 2005).

CONCLUSION

La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, nous assistons à une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif.

Depuis l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa* en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Les travaux, portant sur la résistance aux antibiotiques dans les pays méditerranéens, montrent en général que les métallo- β -lactamases de type VIM-2 sont les carbapénèmases les plus répandues dans ces pays.

Cette étude a révélé que la présence d'inactivation par mutation du gène *oprD* est le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* dans les hôpitaux de l'ouest algérien, suivi par l'acquisition de métallo- β -lactamases VIM-2. Ces résultats pourraient être dus à une utilisation irrationnelle de l'imipénème dans le traitement des bactéries à Gram négatif multirésistantes dans nos hôpitaux.

Les données épidémiologiques montrent bien que si la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques n'augmente pas de façon globale en Algérie, la nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec l'émergence de carbapénèmases. Ces souches en règle multirésistantes restent encore confinées sous forme de petits foyers en Algérie, mais le risque d'extension est bien présent. Le risque d'importation à partir de pays voisins où ces souches sont plus répandues, comme c'est le cas aujourd'hui dans les pays méditerranéens, doit également être pris en compte. Ceci doit donc appeler à une forte vigilance en dépistant précocement ces mécanismes de résistance et renforcer les mesures d'hygiène autour des cas d'infection ou de portage afin d'éviter leur transmission.

L'analyse par MLST des souches contenant les mêmes séquences *oprD* montre qu'elles appartiennent aux mêmes clones avec le même ST. Cette corrélation entre ces deux techniques permet d'utiliser les mutations sur le gène *oprD* pour le typage des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème. Ce résultat a été confirmé par la suite dans une étude récente (Al Bayssari *et al.*, 2014).

Plusieurs clones épidémiques de souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème ont été détectés dans les principaux centres hospitalo-universitaires du nord-ouest algérien. La majorité des souches épidémiques ont été associées à l'un des principaux complexe clonal méditerranéen; CC244 (Maatallah *et al.*, 2011) et correspond à un clone international à haut risque.

La résistance de *P. aeruginosa*, aux fluoroquinolones et aux aminosides est devenue préoccupante en milieu hospitalier. L'avènement de ces mécanismes de résistance implique une utilisation plus rationnelle de ces antibiotiques tant qu'en milieu hospitalier qu'en médecine communautaire. Les souches isolées à partir du CHU d'Oran, en particulier ceux appartenant au clone ST244, résistantes à plusieurs β -lactamines, présentaient des résistances associées aux aminosides et à la ciprofloxacine. Notons également la présence du gène *aac(3')-II* ainsi que les gènes *aad-A1* et *aad-A13* responsables de la résistance aux aminosides chez quelques isolats. D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés dans la même période d'étude à l'est algérien, à savoir les gènes *aadB* et *aacA4*, identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase VIM-2 (Touati *et al.*, 2013).

La résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* s'est révélée plus importante en réanimation. En effet les différences observées peuvent être liées à la prise en charge des patients impliquant des soins invasifs, à la pression antibiotique exercée et à un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier. Les mesures de prévention de la transmission croisée soulignent les enjeux économiques de l'amélioration de l'hygiène hospitalière et de la lutte contre la surinfection acquise à l'hôpital. Il serait intéressant de mettre en œuvre un programme de formation d'hygiénistes au sein des hôpitaux ainsi que des enquêtes de consommation d'antibiotiques en Algérie, à l'hôpital comme en ville, ainsi qu'un programme d'éducation et de formation des professionnels et des usagers.

La diffusion rapide des souches résistantes aux antibiotiques représente une menace thérapeutique et épidémiologique majeure et nécessite la mise en œuvre de procédures d'hygiène strictes et des études régulières de surveillance de cette résistance.

Mis à part le développement de mécanismes d'adaptation des germes pathogènes en milieu environnant, plusieurs facteurs favorisent l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance, comme l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés,

l'automédication ainsi que la prescription d'un traitement antibiotique sans la réalisation d'antibiogramme standard.

Bien que l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a longtemps contribué à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, des études récentes ont pu démontrer que la résistance pouvait émerger à partir de sources anciennes et/ou environnementales, bien avant la découverte des antibiotiques (Rolain *et al.*, 2012).

Compte tenu du pouvoir épidémique élevé de ces souches et des impasses thérapeutiques auxquelles celles-ci peuvent conduire, le dépistage et la détection des gènes de résistance sont des éléments fondamentaux de la maîtrise de leur dissémination. Néanmoins, sur le plan technique cette détection s'avère très difficile, voire impossible en Algérie, il serait donc nécessaire d'équiper les laboratoires de microbiologie du matériel approprié pour la détection rapide et fiable des gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques

Références bibliographiques

- Aggoune-Khinache,N., Bensorsa,D., Henniche,F.Z., Daoudi,M., Abdouni,M.A., Chabani,A. *et al.* (2009) [Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria]. *Med Mal Infect* **39**: 413-414.
- Ait El Kadi, M., Aghrouch,M., Seffar,M., El,h.J., Bouklouze,A., Cherrah,Y. *et al.* (2006) [Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to imipenem by production of metallo-beta-lactamase]. *Med Mal Infect* **36**: 386-389.
- Aktas,Z., Poirel,L., Salcioglu,M., Ozcan,P.E., Midilli,K., Bal,C. *et al.* (2005) PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* **11**: 193-198.
- Al Bayssari,C., Diene,S.M., Loucif,L., Gupta,S.K., Dabboussi,F., Mallat,H. *et al.* (2014) Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of oprD Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 4966-4970.
- Amazian,K., Rossello,J., Castella,A., Sekkat,S., Terzaki,S., Dhidah,L. *et al.* (2010) [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. *East Mediterr Health J* **16**: 1070-1078.
- Ambler,R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**: 321-331.
- Aubert,D., Naas,T., and Nordmann,P. (2012) Integrase-mediated recombination of the veb1 gene cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase. *PLoS One* **7**: e51602.
- Aubron,C., Poirel,L., Fortineau,N., Nicolas,P., Collet,L., and Nordmann,P. (2005) Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist* **11**: 254-259.
- Baba Ahmed-Kazi,T.Z., Decre,D., Genel,N., Boucherit-Otmani,Z., Arlet,G., and Drissi,M. (2013) Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb Drug Resist* **19**: 185-190.
- Bahar,G., Mazzariol,A., Koncan,R., Mert,A., Fontana,R., Rossolini,G.M., and Cornaglia,G. (2004) Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* **54**: 282-283.
- Bakour,S., Kempf,M., Touati,A., Ait,A.A., Haouchine,D., Sahli,F., and Rolain,J.M. (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol* **61**: 1341-1343.
- Ball,P. (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* **46 Suppl T1**: 17-24.

- Bebrone,C., Bogaerts,P., Delbruck,H., Bennink,S., Kupper,M.B., Rezende de,C.R. *et al.* (2013) GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 396-401.
- Bergmans,D.C., Bonten,M.J., van Tiel,F.H., Gaillard,C.A., van der Geest,S., Wilting,R.M. *et al.* (1998) Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* **53**: 1053-1058.
- Berrazeg,M., Diene,S.M., Drissi,M., Kempf,M., Richet,H., Landraud,L., and Rolain,J.M. (2013) Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* **8**: e61428.
- Bert,F., Branger,C., and Lambert-Zechovsky,N. (2002) Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* **50**: 11-18.
- Boutoille,D., Jacqueline,C., Le,M., V, Potel,G., and Caillon,J. (2009) In vivo impact of the MexAB-OprM efflux system on beta-lactam efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Antimicrob Agents* **33**: 417-420.
- Bure,A., Legrand,P., Arlet,G., Jarlier,V., Paul,G., and Philippon,A. (1988) Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**: 780-782.
- Bush,K., and Jacoby,G.A. (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 969-976.
- Castanheira,M., Mendes,R.E., Walsh,T.R., Gales,A.C., and Jones,R.N. (2004) Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2344-2345.
- Cornaglia,G., Giamarellou,H., and Rossolini,G.M. (2011) Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* **11**: 381-393.
- Cornaglia,G., Mazzariol,A., Lauretti,L., Rossolini,G.M., and Fontana,R. (2000) Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* **31**: 1119-1125.
- Costerton,J.W., Lewandowski,Z., Caldwell,D.E., Korber,D.R., and Lappin-Scott,H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Costerton,J.W., Stewart,P.S., and Greenberg,E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Curran,B., Jonas,D., Grundmann,H., Pitt,T., and Dowson,C.G. (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **42**: 5644-5649.

- Da Fonseca,E.L., Vieira,V.V., Cipriano,R., and Vicente,A.C. (2007) Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **59**: 576-577.
- Danel,F., Hall,L.M., Duke,B., Gur,D., and Livermore,D.M. (1999) OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1362-1366.
- Danel,F., Hall,L.M., Gur,D., Akalin,H.E., and Livermore,D.M. (1995a) Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **35**: 281-294.
- Danel,F., Hall,L.M., Gur,D., and Livermore,D.M. (1995b) OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1881-1884.
- Danel,F., Hall,L.M., Gur,D., and Livermore,D.M. (1997) OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 785-790.
- Danel,F., Hall,L.M., Gur,D., and Livermore,D.M. (1998) OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3117-3122.
- De Champs,C., Chanal,C., Sirot,D., Baraduc,R., Romaszko,J.P., Bonnet,R. *et al.* (2004) Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* **54**: 634-639.
- De Champs,C., Poirel,L., Bonnet,R., Sirot,D., Chanal,C., Sirot,J., and Nordmann,P. (2002) Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3031-3034.
- Diene,S.M., Bruder,N., Raoult,D., and Rolain,J.M. (2011) Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* **37**: 544-546.
- Doi,Y., and Arakawa,Y. (2007) 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **45**: 88-94.
- Doi,Y., de Oliveira,G.D., Adams,J., and Paterson,D.L. (2007) Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 852-856.
- Drissi,M., Ahmed,Z.B., Dehecq,B., Bakour,R., Plesiat,P., and Hocquet,D. (2008) Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Med Mal Infect* **38**: 187-191.
- Drissi,M., Poirel,L., Mugnier,P.D., Baba,A.Z., and Nordmann,P. (2010) Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**: 1457-1458.

- Dubois,V., Arpin,C., Dupart,V., Scavelli,A., Coulange,L., Andre,C. *et al.* (2008) Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J Antimicrob Chemother* **62**: 316-323.
- Dubois,V., Arpin,C., Noury,P., and Quentin,C. (2002a) Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3624-3626.
- Dubois,V., Poirel,L., Marie,C., Arpin,C., Nordmann,P., and Quentin,C. (2002b) Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 638-645.
- El Garch, F., Bogaerts,P., Bebrone,C., Galleni,M., and Glupczynski,Y. (2011) OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4828-4833.
- El-Mahdy,T.S. (2013) The extended-spectrum AmpC genotype of *Pseudomonas aeruginosa* strains from Egypt: an underlying threat to anti-pseudomonal treatment options. *J Chemother* **26**: 187-9.
- Endimiani,A., Luzzaro,F., Pini,B., Amicosante,G., Maria,R.G., and Toniolo,A.Q. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infect Dis* **6**: 52.
- Falagas,M.E., and Kasiakou,S.K. (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40**: 1333-1341.
- Falagas,M.E., Rafailidis,P.I., and Matthaïou,D.K. (2010) Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* **13**: 132-138.
- Falagas,M.E., Rafailidis,P.I., Matthaïou,D.K., Vitzili,S., Nikita,D., and Michalopoulos,A. (2008) Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. *Int J Antimicrob Agents* **32**: 450-454.
- Flamm,R.K., Weaver,M.K., Thornsberry,C., Jones,M.E., Karlowsky,J.A., and Sahn,D.F. (2004) Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2431-2436.
- Gad,G.F., El-Domany,R.A., Zaki,S., and Ashour,H.M. (2007) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* **60**: 1010-1017.
- Galimand,M., Sabtcheva,S., Courvalin,P., and Lambert,T. (2005) Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2949-2953.

- Garcia-Rodriguez, J.A., and Jones, R.N. (2002) Antimicrobial resistance in Gram-negative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programme. *J Chemother* **14**: 25-32.
- Gaynes, R., and Edwards, J.R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**: 848-854.
- Gessard, C. (1984) Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. *Rev. Infect Dis.* **6 Suppl 3**: 775-776.
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F.J., Artiles, F., Alamo, I., and Oliver, A. (2013) First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **19**: E424-E427.
- Gillis, R.J., White, K.G., Choi, K.H., Wagner, V.E., Schweizer, H.P., and Iglewski, B.H. (2005) Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3858-3867.
- Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Deplano, A., Berhin, C., Huang, T.D., Van, E.J., and Rodriguez-Villalobos, H. (2010) Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* **65**: 866-871.
- Gupta, V., Datta, P., and Chander, J. (2006) Prevalence of metallo-beta-lactamase (MBL) producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in a tertiary care hospital in India. *J Infect* **52**: 311-314.
- Hafiane, A., and Ravaoarino, M. (2008) [Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]. *Med Mal Infect* **38**: 238-247.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., and Akalin, H.E. (1993) OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1637-1644.
- Hammami, S., Boutiba-Ben, B., I, Ghazzi, R., Saidani, M., Amine, S., and Ben, R.S. (2011) Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol* **6**: 106.
- Hammami, S., Gautier, V., Ghazzi, R., Da, C.A., Ben-Redjeb, S., and Arlet, G. (2010) Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. *Clin Microbiol Infect* **16**: 189-193.
- Hammami, S., Ghazzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G., and Redjeb, S. (2009) Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol Biol (Paris)* **57**: 530-535.
- Hanberger, H., Garcia-Rodriguez, J.A., Gobernado, M., Goossens, H., Nilsson, L.E., and Struelens, M.J. (1999) Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* **281**: 67-71.

- Hancock,R.E., and Brinkman,F.S. (2002) Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* **56**: 17-38.
- Hermann,T. (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1841-1852.
- Hocquet,D., Plesiat,P., Dehecq,B., Mariotte,P., Talon,D., and Bertrand,X. (2010) Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3512-3515.
- Hocquet,D., Roussel-Delvallez,M., Cavallo,J.D., and Plesiat,P. (2007) MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 1582-1583.
- Hoffman,L.R., D'Argenio,D.A., MacCoss,M.J., Zhang,Z., Jones,R.A., and Miller,S.I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**: 1171-1175.
- Huang,H., Jeanteur,D., Pattus,F., and Hancock,R.E. (1995) Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol* **16**: 931-941.
- Iraz,M., Duzgun,A.O., Cicek,A.C., Bonnin,R.A., Ceylan,A., Saral,A. *et al.* (2014) Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis* **78**: 292-294.
- Jacobson,R.K., Minenza,N., Nicol,M., and Bamford,C. (2012) VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J Antimicrob Chemother* **67**: 1797-1798.
- Jacoby,G.A. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 2**: S120-S126.
- Janvier,F., Jeannot,K., Tesse,S., Robert-Nicoud,M., Delacour,H., Rapp,C., and Merens,A. (2013) Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3408-3411.
- Jeannot,K., Fournier,D., Muller,E., Cholley,P., and Plesiat,P. (2013) Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase SHV-2a. *J Clin Microbiol* **51**: 673-675.
- Jovcic,B., Lepsanovic,Z., Suljagic,V., Rackov,G., Begovic,J., Topisirovic,L., and Kojic,M. (2011) Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3929-3931.
- Juan,C., Beceiro,A., Gutierrez,O., Alberti,S., Garau,M., Perez,J.L. *et al.* (2008) Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3589-3596.

- Kalai,B.S., Achour,W., Abbassi,M.S., Bejaoui,M., Abdeladhim,A., and Ben,H.A. (2007) Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* **13**: 794-800.
- Kalai,S., Jouaihia,W., Mahjoubi,F., Ghozzi,R., Thabet,L., Ben,R.S. *et al.* (2004) [*Pseudomonas aeruginosa*: a multicentric study of antibiotic resistance (1999-2000)]. *Tunis Med* **82**: 1070-1074.
- Kallel,H., Mahjoubi,F., Dammak,H., Bahloul,M., Hamida,C.B., Chelly,H. *et al.* (2008) Correlation between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in a medical-surgical intensive care unit. *Indian J Crit Care Med* **12**: 18-23.
- Kim,J.Y., Park,Y.J., Kwon,H.J., Han,K., Kang,M.W., and Woo,G.J. (2008) Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J Antimicrob Chemother* **62**: 479-483.
- Kolayli,F., Gacar,G., Karadenizli,A., Sanic,A., and Vahaboglu,H. (2005) PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol Lett* **249**: 241-245.
- Kotsakis,S.D., Papagiannitsis,C.C., Tzelepi,E., Legakis,N.J., Miriagou,V., and Tzouvelekis,L.S. (2010) GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1331-1333.
- Kruger,T., Szabo,D., Keddy,K.H., Deeley,K., Marsh,J.W., Hujer,A.M. *et al.* (2004) Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4263-4270.
- Ktari,S., Mnif,B., Znazen,A., Rekik,M., Mezghani,S., Mahjoubi-Rhimi,F., and Hammami,A. (2011) Diversity of beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist* **17**: 25-30.
- Kulah,C., Mooij,M.J., Comert,F., Aktas,E., Celebi,G., Ozlu,N. *et al.* (2010) Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* **36**: 114-118.
- Labuschagne,C.J., Weldhagen,G.F., Ehlers,M.M., and Dove,M.G. (2008) Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents* **31**: 527-530.
- Lagatolla,C., Tonin,E.A., Monti-Bragadin,C., Dolzani,L., Gombac,F., Bearzi,C. *et al.* (2004) Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. *Emerg Infect Dis* **10**: 535-538.
- Landman,D., Bratu,S., Alam,M., and Quale,J. (2005) Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *J Antimicrob Chemother* **55**: 954-957.
- Laurettil,L., Riccio,M.L., Mazzariol,A., Cornaglia,G., Amicosante,G., Fontana,R., and Rossolini,G.M. (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne

- metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1584-1590.
- Lee,J.K., Lee,Y.S., Park,Y.K., and Kim,B.S. (2005a) Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **25**: 290-295.
- Lee,J.Y., and Ko,K.S. (2012) OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* **40**: 168-172.
- Lee,J.Y., Na,I.Y., Park,Y.K., and Ko,K.S. (2014) Genomic variations between colistin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *J Antimicrob Chemother* **69**: 1248-56.
- Lee,J.Y., Song,J.H., and Ko,K.S. (2011) Identification of nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced colistin susceptibility in Korea. *Microb Drug Resist* **17**: 299-304.
- Lee,K., Lim,Y.S., Yong,D., Yum,J.H., and Chong,Y. (2003) Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* **41**: 4623-4629.
- Lee,S., Park,Y.J., Kim,M., Lee,H.K., Han,K., Kang,C.S., and Kang,M.W. (2005b) Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother* **56**: 122-127.
- Legakis,N.J., Tzouveleki,L.S., Hatzoudis,G., Tzelepi,E., Gourkou,A., Pitt,T.L., and Vatopoulos,A.C. (1995) *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals. Dissemination of plasmids encoding an SHV-5 type beta-lactamase. *J Hosp Infect* **31**: 177-187.
- Leshner,G.Y., Froelich,E.J., Gruett,M.D., Bailey,J.H., and Brundage,R.P. (1962) 1,8-Naphthyridine Derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* **91**: 1063-1065.
- Li,H., Luo,Y.F., Williams,B.J., Blackwell,T.S., and Xie,C.M. (2012) Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol* **302**: 63-68.
- Li,Y., Mima,T., Komori,Y., Morita,Y., Kuroda,T., Mizushima,T., and Tsuchiya,T. (2003) A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **52**: 572-575.
- Libisch,B., Poirel,L., Lepsanovic,Z., Mirovic,V., Balogh,B., Paszti,J. *et al.* (2008) Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**: 330-338.

- Lister,P.D., Wolter,D.J., and Hanson,N.D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**: 582-610.
- Livermore,D.M. (1992) Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 2046-2048.
- Livermore,D.M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **34**: 634-640.
- Llanes,C., Neuwirth,C., El,G.F., Hocquet,D., and Plesiat,P. (2006) Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* **12**: 270-278.
- Luzzaro,F., Mantengoli,E., Perilli,M., Lombardi,G., Orlandi,V., Orsatti,A. *et al.* (2001) Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase. *J Clin Microbiol* **39**: 1865-1870.
- Maatallah,M., Cheriaa,J., Backhrouf,A., Iversen,A., Grundmann,H., Do,T. *et al.* (2011) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* **6**: e25617.
- Mahenthiralingam,E., Campbell,M.E., Foster,J., Lam,J.S., and Speert,D.P. (1996) Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **34**: 1129-1135.
- Mansour,W., Dahmen,S., Poirel,L., Charfi,K., Bettaieb,D., Boujaafar,N., and Bouallegue,O. (2009a) Emergence of SHV-2a extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* **15**: 295-301.
- Mansour,W., Poirel,L., Bettaieb,D., Bouallegue,O., Boujaafar,N., and Nordmann,P. (2009b) Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**: 458-461.
- Marchandin,H., Jean-Pierre,H., De,C.C., Sirot,D., Darbas,H., Perigault,P.F., and Carriere,C. (2000) Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 213-216.
- Masuda,N., Sakagawa,E., Ohya,S., Gotoh,N., Tsujimoto,H., and Nishino,T. (2000) Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3322-3327.
- Mavroidi,A., Tsakris,A., Tzelepi,E., Pournaras,S., Loukova,V., and Tzouveleki,L.S. (2000) Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J Antimicrob Chemother* **46**: 1041-1042.

- Mavroidi,A., Tzelepi,E., Tsakris,A., Miriagou,V., Sofianou,D., and Tzouveleki,L.S. (2001) An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother* **48**: 627-630.
- Mazzariol,A., Mammina,C., Koncan,R., Di,G., V, Di,C.P., Cipolla,D. *et al.* (2011) A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* **17**: 722-724.
- Melano,R., Corso,A., Petroni,A., Centron,D., Orman,B., Pereyra,A. *et al.* (2003) Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* **52**: 36-42.
- Merens, A., Delacour, P., Plesiat, J.D., Cavallo, Jeannot, K. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires* N°**435**: 49-62.
- Mesáros,N., Nordmann,P., Plesiat,P., Roussel-Delvallez,M., Van,E.J., Glupczynski,Y. *et al.* (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* **13**: 560-578.
- Mesli,E., Berrazeg,M., Drissi,M., Bekkhoucha,S.N., and Rolain,J.M. (2013) Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* **17**: e739-e743.
- Miller,G.H., Sabatelli,F.J., Hare,R.S., Glupczynski,Y., Mackey,P., Shlaes,D. *et al.* (1997) The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**: S46-S62.
- Minchella,A., Molinari,L., Alonso,S., Bouziges,N., Sotto,A., and Lavigne,J.P. (2010) [Evolution of antimicrobial resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital between 2002 and 2006]. *Pathol Biol (Paris)* **58**: 1-6.
- Moskowitz,S.M., Ernst,R.K., and Miller,S.I. (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* **186**: 575-579.
- Mugnier,P., Casin,I., Bouthors,A.T., and Collatz,E. (1998a) Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3113-3116.
- Mugnier,P., Dubrous,P., Casin,I., Arlet,G., and Collatz,E. (1996) A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2488-2493.
- Mugnier,P., Podglajen,I., Goldstein,F.W., and Collatz,E. (1998b) Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144** (Pt 4): 1021-1031.

- Muller,C., Plesiat,P., and Jeannot,K. (2011) A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1211-1221.
- Naas,T., Bonnin,R.A., Cuzon,G., Villegas,M.V., and Nordmann,P. (2013) Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **68**: 1757-1762.
- Naas,T., and Nordmann,P. (1999) OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* **5**: 865-879.
- Naas,T., Philippon,L., Poirel,L., Ronco,E., and Nordmann,P. (1999a) An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1281-1284.
- Naas,T., Poirel,L., Karim,A., and Nordmann,P. (1999b) Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **176**: 411-419.
- Nakajima,A., Sugimoto,Y., Yoneyama,H., and Nakae,T. (2002) High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol* **46**: 391-395.
- Nation,R.L., and Li,J. (2009) Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* **22**: 535-543.
- Neonakis,I.K., Scoulica,E.V., Dimitriou,S.K., Gikas,A.I., and Tselentis,Y.J. (2003) Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. *Microb Drug Resist* **9**: 161-165.
- Neuhauser,M.M., Weinstein,R.A., Rydman,R., Danziger,L.H., Karam,G., and Quinn,J.P. (2003) Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA* **289**: 885-888.
- Nickel,J.C., Ruseska,I., Wright,J.B., and Costerton,J.W. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* **27**: 619-624.
- Nikaido,H. (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **178**: 5853-5859.
- Noppe-Leclercq,I., Wallet,F., Haentjens,S., Courcol,R., and Simonet,M. (1999) PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* **150**: 317-322.
- Nordmann,P. (2003) [Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*]. *Ann Fr Anesth Reanim* **22**: 527-530.
- Nordmann,P., and Naas,T. (1994) Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 104-114.

- Nordmann,P., and Poirel,L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* **8**: 321-331.
- Nordmann,P., Ronco,E., Naas,T., Duport,C., Michel-Briand,Y., and Labia,R. (1993) Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 962-969.
- Obritsch,M.D., Fish,D.N., MacLaren,R., and Jung,R. (2004) National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4606-4610.
- Ocampo-Sosa,A.A., Cabot,G., Rodriguez,C., Roman,E., Tubau,F., Macia,M.D. *et al.* (2012) Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1703-1713.
- Over,U., Gur,D., Unal,S., and Miller,G.H. (2001) The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect* **7**: 470-478.
- Ozgumus,O.B., Caylan,R., Tosun,I., Sandalli,C., Aydin,K., and Koksai,I. (2007) Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* **13**: 191-198.
- Pamp,S.J., Gjermansen,M., Johansen,H.K., and Tolker-Nielsen,T. (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol* **68**: 223-240.
- Petropoulou,D., Tzanetou,K., Syriopoulou,V.P., Daikos,G.L., Ganteris,G., and Malamou-Lada,E. (2006) Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. *Microb Drug Resist* **12**: 39-43.
- Philippon,A., Dusart,J., Joris,B., and Frere,J.M. (1998) The diversity, structure and regulation of beta-lactamases. *Cell Mol Life Sci* **54**: 341-346.
- Philippon,L.N., Naas,T., Bouthors,A.T., Barakett,V., and Nordmann,P. (1997) OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2188-2195.
- Piddock,L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.
- Pirnay,J.P., De,V.D., Cochez,C., Bilocq,F., Vanderkelen,A., Zizi,M. *et al.* (2002a) *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* **4**: 898-911.
- Pirnay,J.P., De,V.D., Mossialos,D., Vanderkelen,A., Cornelis,P., and Zizi,M. (2002b) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* **4**: 872-882.

- Pitout,J.D., Revathi,G., Chow,B.L., Kabera,B., Kariuki,S., Nordmann,P., and Poirel,L. (2008) Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clin Microbiol Infect* **14**: 755-759.
- Poirel,L., Brinas,L., Fortineau,N., and Nordmann,P. (2005) Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3593-3597.
- Poirel,L., Gerome,P., De,C.C., Stephanazzi,J., Naas,T., and Nordmann,P. (2002a) Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 566-569.
- Poirel,L., Girlich,D., Naas,T., and Nordmann,P. (2001a) OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 447-453.
- Poirel,L., Lebessi,E., Castro,M., Fevre,C., Foustoukou,M., and Nordmann,P. (2004) Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2277-2279.
- Poirel,L., Menuteau,O., Agoli,N., Cattoen,C., and Nordmann,P. (2003) Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* **41**: 3542-3547.
- Poirel,L., Naas,T., Nicolas,D., Collet,L., Bellais,S., Cavallo,J.D., and Nordmann,P. (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 891-897.
- Poirel,L., Ronco,E., Naas,T., and Nordmann,P. (1999) Extended-spectrum beta-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **5**: 651-652.
- Poirel,L., Weldhagen,G.F., De,C.C., and Nordmann,P. (2002b) A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* **49**: 561-565.
- Poirel,L., Weldhagen,G.F., Naas,T., De,C.C., Dove,M.G., and Nordmann,P. (2001b) GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2598-2603.
- Pollini,S., Maradei,S., Pecile,P., Olivo,G., Luzzaro,F., Docquier,J.D., and Rossolini,G.M. (2013) FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 410-416.
- Poole,K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**: 12-26.
- Poole,K. (2005) Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 479-487.
- Poole,K. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* **2**: 65.

- Pournaras,S., Tsakris,A., Maniati,M., Tzouveleakis,L.S., and Maniatis,A.N. (2002) Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 4026-4028.
- Ramirez,M.S., and Tolmasky,M.E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* **13**: 151-171.
- Ranellou,K., Kadlec,K., Poulou,A., Voulgari,E., Vrioni,G., Schwarz,S., and Tsakris,A. (2012) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in Greece. *J Antimicrob Chemother* **67**: 357-361.
- Riccio,M.L., Pallecchi,L., Docquier,J.D., Cresti,S., Catania,M.R., Pagani,L. *et al.* (2005) Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo- β -lactamase from different Italian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 104-110.
- Riera,E., Cabot,G., Mulet,X., Garcia-Castillo,M., del,C.R., Juan,C. *et al.* (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* **66**: 2022-2027.
- Robin,F., Aggoune-Khinache,N., Delmas,J., Naim,M., and Bonnet,R. (2010) Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 466-470.
- Rodriguez-Martinez,J.M., Poirel,L., and Nordmann,P. (2009) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4783-4788.
- Rolain,J.M., Canton,R., and Cornaglia,G. (2012) Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect* **18**: 615-616.
- Rossolini,G.M., Luzzaro,F., Migliavacca,R., Mugnaioli,C., Pini,B., De,L.F. *et al.* (2008) First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in Gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4023-4029.
- Rossolini,G.M., and Mantengoli,E. (2005) Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **11 Suppl 4**: 17-32.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sardelic,S., Bedenic,B., Colimon-Dupuich,C., Orhanovic,S., Bosnjak,Z., Plecko,V. *et al.* (2012) Infrequent finding of metallo-beta-lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2746-2749.
- Sardelic,S., Pallecchi,L., Punda-Polic,V., and Rossolini,G.M. (2003) Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* **9**: 1022-1023.

- Senda,K., Arakawa,Y., Nakashima,K., Ito,H., Ichiyama,S., Shimokata,K. *et al.* (1996) Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 349-353.
- Seng,P., Rolain,J.M., Fournier,P.E., La,S.B., Drancourt,M., and Raoult,D. (2010) MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* **5**: 1733-1754.
- Shahid,M., and Malik,A. (2005) Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. *Indian J Med Res* **122**: 324-329.
- Shakil,S., Khan,R., Zarrilli,R., and Khan,A.U. (2008) Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* **15**: 5-14.
- Siarkou,V.I., Vitti,D., Protonotariou,E., Ikonomidis,A., and Sofianou,D. (2009) Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1325-1330.
- Sirot,D., Sirot,J., Labia,R., Morand,A., Courvalin,P., Darfeuille-Michaud,A. *et al.* (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **20**: 323-334.
- Stewart,P.S. (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**: 107-113.
- Stewart,P.S., and Costerton,J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138.
- Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrener,P., Hickey,M.J. *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Strateva,T., Ouzounova-Raykova,V., Markova,B., Todorova,A., Marteva-Proevska,Y., and Mitov,I. (2007) Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. *J Chemother* **19**: 140-145.
- Strateva,T., and Yordanov,D. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**: 1133-1148.
- Talon,D., Capellier,G., Boillot,A., and Michel-Briand,Y. (1995) Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Med* **21**: 996-1002.
- Tato,M., Coque,T.M., Baquero,F., and Canton,R. (2010) Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and

conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 320-327.

Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R.N., and Walsh, T.R. (2003) Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* **52**: 583-590.

Touati, M., Diene, S.M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., and Rolain, J.M. (2013) Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2426-2427.

Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.F., Babini, G.S., Douboyas, J., and Livermore, D.M. (2000) Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* **38**: 1290-1292.

Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksali, I. *et al.* (2001) Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* **50**: 642-645.

Vahaboglu, H., Ozturk, R., Aygun, G., Coskuncan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A. *et al.* (1997) Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2265-2269.

Van Alst, N.E., Wellington, M., Clark, V.L., Haidaris, C.G., and Iglewski, B.H. (2009) Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **77**: 4446-4454.

Vatcheva-Dobrevska, R., Mulet, X., Ivanov, I., Zamorano, L., Dobрева, E., Velinov, T. *et al.* (2013) Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist* **19**: 355-361.

Vaziri, F., Peerayeh, S.N., Nejad, Q.B., and Farhadian, A. (2011) The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics (Sao Paulo)* **66**: 1519-1522.

Vidaillac, C., Benichou, L., and Duval, R.E. (2012) In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 4856-4861.

Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J.R., Sanz, F. *et al.* (2009) Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4930-4933.

Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Orellana, M.A., Sanz, F. *et al.* (2012) VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis* **18**: 1235-1241.

- Vogne,C., Aires,J.R., Bailly,C., Hocquet,D., and Plesiat,P. (2004) Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1676-1680.
- Walters,M.C., III, Roe,F., Bugnicourt,A., Franklin,M.J., and Stewart,P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 317-323.
- Wang,D.D., Sun,T.Y., and Hu,Y.J. (2007) Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Chin Med J (Engl)* **120**: 68-70.
- Watanabe,M., Iyobe,S., Inoue,M., and Mitsuhashi,S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 147-151.
- Weldhagen,G.F., Poirel,L., and Nordmann,P. (2003) Ambler Class A Extended-Spectrum B-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2385-2392.
- Williams,E.P., and Cameron,K. (1894) Infection by the *Bacillus Pyocyaneus* a Cause of Infantile Mortality. *Public Health Pap Rep* **20**: 355-360.
- Yagi,T., Kurokawa,H., Shibata,N., Shibayama,K., and Arakawa,Y. (2000) A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 53-56.
- Yakupogullari,Y., Poirel,L., Bernabeu,S., Kizirgil,A., and Nordmann,P. (2008) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother* **61**: 221-222.
- Yamane,K., Doi,Y., Yokoyama,K., Yagi,T., Kurokawa,H., Shibata,N. *et al.* (2004) Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2069-2074.
- Yokoyama,K., Doi,Y., Yamane,K., Kurokawa,H., Shibata,N., Shibayama,K. *et al.* (2003) Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**: 1888-1893.
- Zhang,L., and Mah,T.F. (2008) Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* **190**: 4447-4452.
- Zhao,W.H., and Hu,Z.Q. (2010) Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol* **36**: 245-258.