

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/20

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M^{lle} BOUDEHANE Ryma

Thème

*Portage de bacilles à Gram négatif résistants aux
carbapénèmes en milieu hospitalier*

Soutenu le : 29 / 09 / 2020

Devant le jury composé de :

| <i>Nom et Prénom</i> | <i>Grade</i> | | |
|-------------------------------|--------------|------------------------|----------------------|
| <i>Mme HAMID Sonia</i> | <i>MCB.</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Présidente</i> |
| <i>Mme LEZZOUM ATEK Sara</i> | <i>MCB.</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Examinatrice</i> |
| <i>Mme SAIT DIB Sabrina</i> | <i>MCB.</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Promotrice</i> |
| <i>Mme GHAROUT SAIT Alima</i> | <i>MCB.</i> | <i>Univ. de Bejaia</i> | <i>Co-promotrice</i> |

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord notre Dieu Allah, le tout puissant de m'avoir donné la bonne santé, la patience, la force et la volonté pendant toutes ces années d'étude et durant la réalisation de ce modeste travail.

J'adressons ma vive gratitude et mes sincères remerciements à ma chère promotrice Madame SAIT'DIB Sabrina et à ma co-promotrice Madame GHAROUT SAIT'Alima, d'avoir ont bien voulu encadrer ce travail, je les remercie chaleureusement pour leur gentillesse, aide et patience, ainsi que pour leurs précieux conseils, leurs judicieuses orientations, leur encouragement et leur disponibilité jusqu'à la fin .

J'exprime mes remerciements aux membres du jury, Madame HAMID Sonia qui a honoré de sa présence ma soutenance et Madame LEZZOUM ATEK Sara qui a consacré tout son temps pour examiner mon manuscrit.

Je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements à tous mes enseignants, qui m'ont accompagné tout le long de mon cursus universitaire.

Ces remerciements vont également au corps professoral et administratif de la faculté SNV-ST de l'université de Bouira Akli Mouhadj Oulhadj pour tous les efforts fournis pour assurer aux étudiants une formation actualisée.

Ryma...





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes chers parents, **Kamal** et **Nora**, ma vie de bonheur. Leur patience sans fin, leur compréhension et leur encouragement sont pour moi le soutien indispensable qu'ils ont toujours su m'apporter. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté. Que Dieu le tout puissant vous protège.*

*A ma chère grande- mère **Yamna**, ma source de tendresse. Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que tu n'avez jamais cessé de formuler dans tes prières. Que Dieu te préserve ta santé et te procure une longue vie.*

*A mon cher frère **Faiçal Abdelhak**, Que Dieu le plus puissant te garde et exauce toutes tes vœux.*

A mes oncles, mes tantes, ma grande famille, mon cher trésor. Que Dieu vous bénit.

*A ma promotrice M^{me} **SAIT DIB Sabrina**, la bouffée d'oxygène qui me ressource toujours dans les moments pénibles, Je prie Dieu le tout puissant pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.*

A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.

A vous tous, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Ryma...



Merci

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Chapitre I: Les antibiotiques et l'antibiorésistance

| | |
|---|----|
| I. Les antibiotiques et l'antibiorésistance | 3 |
| I.1. Les antibiotiques | 3 |
| I.1.1. Définition | 3 |
| I.1.2. Conditions d'action des antibiotiques | 3 |
| I.1.3. Classification, mécanisme et spectre d'action..... | 4 |
| I.2. La résistance aux antibiotiques | 11 |
| I.2.1. Définition | 11 |
| I.2.2. Types de résistance..... | 12 |
| I.2.3. Origine et support génétique de la résistance | 13 |
| I.2.4. Modalités de transfert génétique de la résistance | 14 |
| I.2.5. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques | 16 |

Chapitre II: La résistance des bacilles à Gram négatif aux carbapénèmes

| | |
|--|----|
| II. La résistance des bacilles à Gram négatif aux carbapénèmes | 18 |
| II.1. Bacilles à Gram négatif | 18 |
| II.1.1. Sources et modes de transmission..... | 18 |
| II.1.2. Pouvoir pathogène | 19 |
| II.1.3. Caractères d'identification | 20 |
| II.2. Les carbapénèmes | 23 |
| II.2.1. Définition | 23 |
| II.2.2. Structure chimique et classification | 23 |
| II.2.3. Effet et spectre d'action | 24 |
| II.2.4. Mécanisme d'action et activité in vitro..... | 25 |
| II.3. La résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif..... | 25 |
| II.3.1. Les mécanismes de résistance..... | 26 |
| II.3.2. Classification et propriétés des carbapénèmases | 26 |

Chapitre III: Détection des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

| | |
|--|----|
| III. Détection des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes | 31 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| III.1. Présentation de l'étude | 31 |
| III.2. Recueil de données..... | 31 |
| III.3. Prélèvements | 32 |
| III.3.1. Prélèvement rectale..... | 32 |
| III.3.2. Prélèvement de surface | 33 |
| III.4. Isolement et purification..... | 34 |
| III.5. Identification | 36 |
| III.6. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé..... | 36 |
| III.6.1. Principe générale | 36 |
| III.6.2. Manipulation..... | 37 |
| III.6.3. Avantages et inconvénients | 38 |
| III.7. Détection des carbapénèmases | 38 |
| III.7.1. Méthodes phénotypiques | 39 |
| III.7.2. Méthodes génotypiques | 48 |

Chapitre IV: Portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

| | |
|---|----|
| IV. Portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes..... | 50 |
| IV.1. Portage des bacilles à Gram négatif | 50 |
| IV.1.1. Définition du portage bactérien | 50 |
| IV.1.2. Saprophyte ou commensale ? | 50 |
| IV.1.3. Causes induisant le portage | 52 |
| IV.1.4. Facteurs de risques du portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes..... | 53 |
| IV.2. Epidémiologie du portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes | 54 |
| IV.2.1. À l'échelle mondiale | 54 |
| IV.2.2. À l'échelle nationale..... | 55 |
| Conclusion..... | 58 |

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

AAF : Aéro-anaérobie facultatif.

ADH : Arginine déshydrogénase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Ag H : Antigène flagellaire.

Ag K : Antigène capsulaire.

Ag O : Antigène somatique.

AmpC : Chromosomal located céphalosporinase.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert.

AS : Aérobie stricte.

BA : Acide boronique.

BGN : Bacilles à Gram négatif.

BGN-NF : Bacilles à Gram négatif non fermentaires.

BGN-RC : Bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes.

BLSE : β -lactamases à spectre étendu.

BMR : Bactéries multirésistantes.

BYG Carba test : Bogaerts-Yunus-Glupczynski carba test.

Carba NP test : Carba Nordmann-Poirel test.

CA-SFM/EUCAST : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

CIM: Carbapenem inactivation method.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

COVID-19 : Coronavirus disease 2019.

CTX-M: Cefotaximase, first isolated at Munich.

C3G : Céphalosporines de 3ème génération.

C4G : Céphalosporines de 4ème génération.

DHP : Déshydropeptidase.

DPA : Acide dipicolinique.

EDTA: Ethylenediamine tetra acetic acid.

EMB : Eosin methylene blue.

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases.

ESAC : Céphalosporinases à spectre étendu.

GES : Guyana extended-spectrum.

GIM : German imipenemase.

HPCi : Hygiène, prévention et contrôle de l'infection.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

IAI : Intra abdominal infection.

IMI : Imipenem hydrolysing β-lactamase.

IMP : Imipenemase.

KHM : Kyorin health sciences metallo-β-lactamase.

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

LDC : Lysine décarboxylase.

MALDI TOF : Matrix assisted laser desorption ionisation/time of flight.

MALDI-TOF MS : Matrix assisted laser desorption ionisation/time of flight mass spectrometry.

MH : Mueller-hinton.

MBLs: Metallo-β-lactamases.

NaCl : Chlorure de sodium.

NDM : New delhi metallo-β-lactamase.

NMC : Not metalloenzyme carbapenemase.

NmcA : Non-metallo carbapenemase A.

ODC : Ornithine décarboxylase.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ONPG : Orthonitrophényl- β -galactoside.

OXA : Oxacillinase.

PAV : Ventilator-associated pneumonia.

PCR : Polymérase chain reaction.

PG : Peptidoglycane.

pH : Potentiel hydrogène.

PLP : Protéine liant la pénicilline.

RN : Nitrate réductase.

SHV : Sulfhydryl variable.

SME : *Serratia marcescens* enzyme.

SPM: Sao Paulo metallo- β -lactamase.

TDA : Tryptophane désaminase.

TEM : Temoniera.

TIC : Tests immunochromatographiques.

UDP : Uridine diphosphate.

UFC: Unité formant colonie.

UTI : Urinary tract infections.

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

VP : Voges-proskauer.

Zn²⁺ : Ions zinc.

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : Conditions d'action des antibiotiques..... | 4 |
| Figure 02 : Mécanismes inter et intracellulaires impliqués dans les transferts horizontaux de gènes..... | 16 |
| Figure 03 : Principales stratégies mises en place par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques | 17 |
| Figure 04 : Structures des carbapénèmes. (A) : structure générale, (B) : structures chimiques | 24 |
| Figure 05 : Ecouvillonnage rectal : mode opératoire | 33 |
| Figure 06 : Schéma de prélèvement de surface à l'écouvillon..... | 34 |
| Figure 07 : L'algorithme de criblage proposé par l'EUCAST en 2015 | 40 |
| Figure 08 : Principe du test de Hodge modifié. (1) Souche d' <i>Escherichia coli</i> sensible à l'ertapénème, (2) Souche positive, (3) et (4) Souches négatives | 41 |
| Figure 09 : Schéma du test CIM | 42 |
| Figure 10 : (A) Principe du Carba NP test, (B) Résultats du Carba NP test..... | 44 |
| Figure 11 : Potentiostat maison et électrode jetable à huit sondes..... | 45 |
| Figure 12 : Analyse MALDI-TOF MS de l'imipénème. (A) Imipénème et son produit de dégradation naturel, (B) Spectres de masse de l'imipénème et de son produit de dégradation naturel tel que déterminé à l'aide du spectromètre de masse..... | 46 |
| Figure 13 : Test RESIST-3 OKN : procédure et lecture des résultats..... | 47 |
| Figure 14 : Carbapénèmases décrites dans des isolats cliniques de bacilles à Gram négatif d'Algérie | 57 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne | 05 |
| Tableau II : Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques | 07 |
| Tableau III : Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique..... | 09 |
| Tableau IV : Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique | 11 |
| Tableau V : Sources et modes de transmission des bacilles à Gram négatifs..... | 19 |
| Tableau VI : Principales infections dues aux bacilles à Gram négatif | 20 |
| Tableau VII : Principales caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques, enzymatiques et antigéniques des bacilles à Gram négatif | 21 |
| Tableau VIII : Caractéristiques des principales carbapénèmases acquises chez les bacilles à Gram négatif..... | 30 |
| Tableau IX : Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey | 35 |
| Tableau X : Valeurs critiques de la CMI (mg / L) pour les carbapénèmes selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2019 | 39 |



Introduction

Introduction

Depuis leur découverte, les antibiotiques ont sans doute été considérés comme une des révolutions médicales du XX^{ème} siècle. Ils ont apporté un immense bénéfice à l'humanité, en permettant de soigner de nombreuses infections bactériennes, et en faisant diminuer considérablement la mortalité qui y était associée (Ziai, 2014). L'âge d'or a duré un demi-siècle, période durant laquelle les maladies infectieuses furent considérées comme définitivement vaincues. Et si, depuis le début, l'émergence de résistances des bactéries aux antibiotiques était observée, on a été très longtemps persuadé que l'innovation permanente et l'invention de nouvelles molécules nous donneraient toujours une longueur d'avance dans la guerre déclarée entre l'homme et les microbes (Trémolières, 2010).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène mondial qui ne connaît ni frontières géographiques, ni barrières d'espèce (homme, animal, microorganisme) (Maugat *et al.*, 2016). Ponctuelle au départ, cette antibiorésistance devient chaque année plus préoccupante, elle représente maintenant une menace de santé publique d'envergure mondiale (Ziai, 2014).

Compte tenu de la situation épidémiologique actuelle marquée par la propagation rapide des souches multirésistantes et en raison du risque d'impasse thérapeutique pouvant à terme mettre en péril les grandes avancées de la médecine moderne, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi un classement des principaux pathogènes bactériens résistants aux antibiotiques pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques sont prioritaires. Parmi ces pathogènes, les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes, impliqués aussi bien dans les infections nosocomiales (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) que communautaires (entérobactéries), sont la première priorité (Tacconelli *et al.*, 2017).

La résistance aux carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours, est préoccupante du fait de son ampleur dans certains pays et de la vitesse de transmission du mécanisme de résistance (carbapénémase) à différentes espèces bactériennes, via des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons et transposons) (Gniadek *et al.*, 2016). Cette résistance résulte essentiellement de β -lactamases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), de métallob β -lactamases et d'oxacillinases de type OXA-48 chez les entérobactéries ; de métallob-carbapénémases et la modification isolée de la porine OprD chez *P. aeruginosa*, alors que chez *A. baumannii*, elle est fortement contribué par certaines oxacillinases quasi-spécifiques d'espèces (Nordmann, 2010).

Dans toutes ces espèces bactériennes, ces déterminants confèrent une multirésistance non seulement aux carbapénèmes mais également, aux autres β -lactamines et à d'autres familles d'antibiotiques en raison de leurs gènes habituellement physiquement associés à des gènes de résistance aux aminosides, aux fluoroquinolones, etc. (Nordmann, 2010).

Une fois établie, cette multirésistance ne régresse pas spontanément. C'est pourquoi, l'une des principales mesures pour prévenir l'émergence et la dissémination incontrôlée des souches résistantes aux carbapénèmes repose sur le dépistage rapide de leur portage digestif chez les patients asymptomatiques et la mise en isolement de ces patients (Nordmann, 2010).

À cet effet, nous nous sommes intéressés au portage de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes en milieu hospitalier, l'objectif est de mieux caractériser ce portage dans les établissements de santé, notamment dans les services à haut risques, de faire le point sur l'intérêt de la mise en surveillance des patients colonisés, aussi de comprendre les modes d'acquisitions des souches résistantes et les facteurs de risques associés.

Le présent manuscrit est organisé en 04 chapitres. Le premier chapitre est consacré pour accorder une vue d'ensemble sur les antibiotiques et l'antibiorésistance. Le deuxième chapitre traite en particulier la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Vu la propagation accrue et durable du Covid-19, nous n'avons pas pu initier notre recherche expérimentale telle qu'elle a été programmée. Pour cela, nous nous sommes limités à une synthèse bibliographique analytique comportant le troisième dédié à décrire la démarche générale à poursuivre et les différents tests de dépistage disponibles, tandis que l'objectif du quatrième chapitre est de présenter des informations actualisées et orientées pour le portage et son épidémiologie.



Chapitre I:

Les antibiotiques et l'antibiorésistance

I. Les antibiotiques et l'antibiorésistance

Depuis l'avènement de l'antibiothérapie, l'utilisation des antibiotiques semble s'accompagner inexorablement de l'émergence de bactéries résistantes. Cette résistance peut être soit :

- Le résultat de mutations spontanées avec activation ou modification de déterminants chromosomiques déjà présents dans le génome bactérien.
- La conséquence de l'acquisition de gènes situés sur des éléments génétiques mobiles (Cattoir, 2004).

I.1. Les antibiotiques

I.1.1. Définition

L'adjectif « antibiotique » utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes (Muylaert & Mainil, 2012).

Sur base de l'étymologie du mot « antibiotique » (du grec *anti* : contre, *biotikos* : concernant la vie), (Muylaert & Mainil, 2012) et selon la définition proposée par Turpin et Velu, on définit un composé de ce type comme toute substance chimique, élaborée par un microorganisme ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes (Yves & Michel, 2009).

I.1.2. Conditions d'action des antibiotiques

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme/antibiotique d'une part et antibiotique/bactérie d'autre part.

Pour agir efficacement, l'antibiotique doit donc remplir certaines conditions (figure 01), à savoir : avoir une cible et un mode d'action lui permettant d'agir sur le germe en cause ; atteindre la cible, c'est-à-dire : parvenir là où est ce germe et jusqu'au site intime d'action, à des concentrations suffisamment élevées de sa forme active sans qu'il soit ni dégradé ni rejeté; et interagir efficacement avec la cible, c'est-à-dire : qu'il reste le temps suffisant lui permettant soit de détruire le germe soit d'en arrêter sa multiplication.

Si l'une des conditions n'est pas remplie, la bactérie est donc résistante à l'antibiotique.

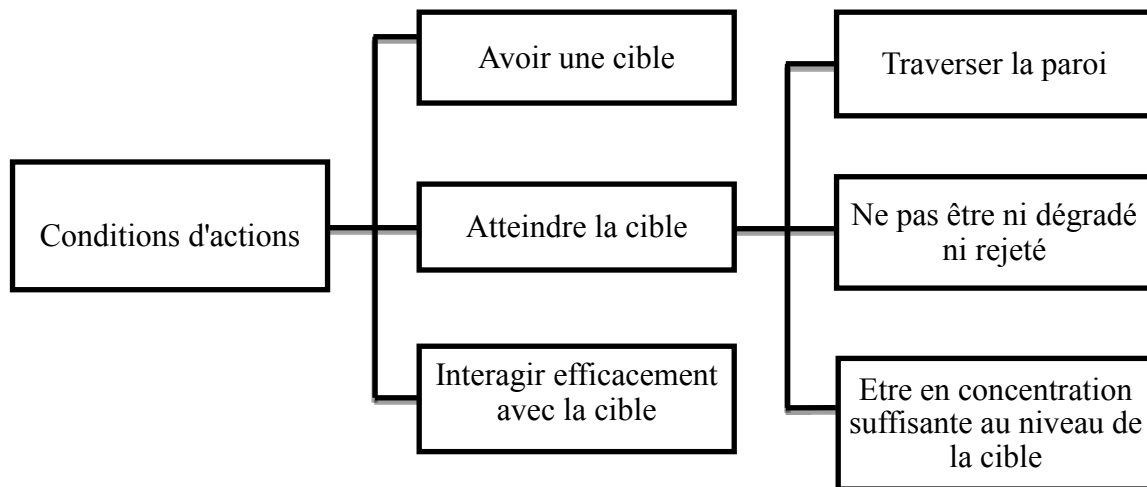


Figure 01 : Conditions d'action des antibiotiques.

I.1.3. Classification, mécanisme et spectre d'action

Pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par : une activité antibactérienne, une activité en milieu organique, une bonne absorption, une bonne diffusion dans l'organisme et il devra idéalement atteindre une cible spécifique ou affecter une voie métabolique absente ou peu active chez les eucaryotes mais indispensables à la vie de la bactérie (Yala *et al.*, 2001).

En fonction de l'activité temps-dépendante (efficacité dépend du temps que va passer l'antibiotique dans l'organisme) et de l'activité concentration-dépendante (la concentration qui va être importante à un moment donner pour déterminer l'efficacité de l'antibiotique sur la bactérie), l'antibiotique peut avoir soit un effet bactériostatique (inhibition de la croissance bactérienne) soit un effet bactéricide (léta) (Denis *et al.*, 2016).

À l'échelon moléculaire, les antibiotiques agissent par :

- Toxicité sélective au niveau de : la synthèse de la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines et des acides nucléiques.
- Inhibition compétitive : dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.

La classification des antibiotiques peut se faire selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le spectre d'activité et le mécanisme d'action (Yala *et al.*, 2001).

Selon leur mode d'action, les antibiotiques sont classés en 5 groupes (Tableau I, II, III, et IV) qui se différencient par : leur cible dans la bactérie (la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, la synthèse protéique et la synthèse des acides nucléique), leur effet: bactéricide ou bactériostatique, leur spectre d'activité et mécanisme d'action.

Tableau I : Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne (Chopra & Roberts, 2001; Yala *et al.*, 2001; Gaynor & Mankin, 2005; Chaussade *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2016; Gallagher & MacDougall, 2016).

| Familles | | Antibiotiques (exemples) | Spectre d'activité | Effet d'antibiotique | Mécanisme d'action |
|---------------------|-----------------|--|--|--|---|
| β-lactamines | Pénicillines | Ampicilline Amoxicilline | -Variable selon la molécule - Actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif | -Effet bactéricide type temps dépendant | - Les β-lactamines agissent sur les bactéries en phase de multiplication au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (PG) entraînant leur lyse. - Ils traversent la paroi pour assurer : 1- Inhibition de la synthèse du PG par analogie de structure avec le substrat des PLP (Protéine liant la Pénicilline : une enzyme, transpeptidase, transglycosylase et carboxypeptidase, impliquée dans la synthèse du PG) le dipeptide (D- |
| | Céphalosporines | Céfoxitine Céfotaxime Céftazidime Céfepime Cefpirome | | | |
| | Monobactames | Aztréonam | | | |

| | | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|---|---|--|---|
| | Carbapénèmes | Imipénème Méropénème Ertapénème Doripénème | | | ALA—D-ALA) et agissent donc par inhibition compétitive. La fixation des β -lactamines aux PLP est irréversible par des liaisons covalentes. 2- Activation de systèmes autolytiques entraînant la dégradation du PG et donc la lyse bactérienne. |
| | Inhibiteurs de la β -lactamase | Acide clavulanique + Ticarcilline ou Amoxicilline | | | |
| Glycopeptides | | Vancomycine Teicoplanine | -Spectre d'activité étroit réservé aux bactéries à Gram positif | -Bactéricidie lente avec une action temps dépendante | - Ils inhibent la synthèse du peptidoglycane par fixation sur le motif D-ALA—D-ALA terminal du pentapeptide-disaccharide en empêchant par encombrement stérique les transglycosidases et les transpeptidases (pas d'allongement des chaînes polysaccharidiques). |

| | | | | |
|---------------------|--|--|--------------------|---|
| Fosfomycines | | <ul style="list-style-type: none"> -Spectre d'activité large -Actif sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif | -Effet bactéricide | <ul style="list-style-type: none"> - La fosfomycine agit sur une étape précoce de la synthèse de la muréine (étape cytoplasmique). - Elle inhibe la synthèse de l'acide N-acétylmuramique en empêchant la conversion de l'UDP-N-acétylglucosamine en acide UDP-N-acétylmuramique en se liant par une liaison covalente à un résidu cystéine de la pyruvyl-transférase. - L'inhibition dite compétitive se fait par analogie stérique avec le phosphoénolpyruvate (substrat de la transférase). |
|---------------------|--|--|--------------------|---|

Tableau II : Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques (Chopra & Roberts, 2001; Yala *et al.*, 2001; Gaynor & Mankin, 2005; Chaussade *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2016; Gallagher & MacDougall, 2016).

| Familles | Antibiotiques (exemples) | Spectre d'activité | Effet d'antibiotique | Mécanisme d'action |
|-------------------|---|---|--|--|
| Sulfamides | <ul style="list-style-type: none"> Sulfapyridine Sulfamoxole Sulfaguanidine Sulfacélamide | <ul style="list-style-type: none"> -Spectre d'activité large mais actuellement plus réduit | <ul style="list-style-type: none"> -Effet bactériostatique type temps dépendant | <ul style="list-style-type: none"> -Les sulfamides inhibent la synthèse des folates, substances nécessaires à la production des acides nucléiques et des acides aminés. |

| | | | | |
|----------------------------------|---|--|---|--|
| <p>Nitro-5-imidazolés</p> | <p>Tinidazole Métronidazole</p> | <p>-Spectre étroit limité aux bactéries anaérobies et aux protozoaires</p> | <p>-Effet bactéricide</p> | <p>- Les Nitro-5-imidazolés modifient l'ADN bactérien par formation de radicaux libres provoquant sa fragmentation.</p> |
| <p>Quinolones</p> | <p>Acide oxolinique Acide nalidixique</p> | <p>- Spectre étroit limité aux bactéries à Gram négatif</p> | <p>-Effet bactéricide</p> | <p>- Les quinolones et les fluoroquinolones agissent par inhibition rapide de la synthèse ou l'expression de l'ADN bactérien en empêchant la réplication et transcription. - Le mécanisme d'action consiste en une inhibition des enzymes impliquées dans la réplication et à la transcription de l'ADN :</p> |
| <p>Fluoroquinolones</p> | <p>Ofloxacin Levofloxacin Ciprofloxacine Enoxacin</p> | <p>-Spectre d'activité large</p> | <p>-Bactericidie rapide de type concentration et temps dépendante</p> | <p>l'ADN gyrase (ou topoisomérase II) chez les Gram négatifs et de la topoisomérase IV chez les Gram positifs. - L'inhibition du complexe (ADN bactérien—enzymes) empêche: le «surenroulement» de l'ADN, le relâchement de l'ADN «surenroulé» et entraîne la séparation de la double chaîne hélicoïdale de l'ADN et donc sa rupture.</p> |

Tableau III : Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique (Chopra & Roberts, 2001; Yala *et al.*, 2001; Gaynor & Mankin, 2005; Chaussade *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2016; Gallagher & MacDougall, 2016).

| Familles | Antibiotiques (exemples) | Spectre d'activité | Effet d'antibiotique | Mécanisme d'action |
|----------------------|--|--|-------------------------|---|
| Tétracyclines | Chlortétracycline Tétracycline base Doxycycline Minocycline | - Spectre d'activité très large - Agit sur de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et anaérobies, mycoplasmes, chlamydies et rickettsies | -Effet bactériostatique | - Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en interférant avec la sous-unité 30S ribosomale. - Elles empêchent l'association de l'aminoacyl-ARNt avec le ribosome bactérien et donc inhibe la phase d'élongation de la synthèse protéique. |
| Macrolides | Érythromycine Clarythromycine Azithromycine Spiramycine | - Spectre d'activité étroit et ils sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires | -Effet bactériostatique | - Les macrolides agissent sur la synthèse protéique par inhibition de la phase d'élongation. - Ils se fixent de façon réversible sur la sous unité 50S du ribosome empêchant donc la transpeptidation et la translocation. |

| | | | | |
|-------------------|--|--|---|--|
| Aminosides | <p>Néomycine Amikacine Gentamicine Streptomycine</p> | <p>- Spectre d'activité est large - Ils sont inactif sur les bactéries anaérobies, les streptocoques et les entérocoques</p> | <p>-Effet rapidement bactéricide type concentration-dépendant</p> | <p>- Les aminosides se fixent de façon irréversible sur la sous unité 30S au site P du ribosome bactérien ce qui induit des erreurs d'initiation de la synthèse protéique et donc blocage de la traduction. - Ils provoquent une mauvaise lecture du code génétique, conduisant à une formation incorrecte des protéines et à une interruption de la synthèse des protéines.</p> |
| phénicoles | <p>Chloramphénicol Thiamphénicol</p> | <p>-Spectre d'activité est large</p> | <p>-Effet bactériostatique</p> | <p>-Les phénicoles inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique par fixation sur la sous-unité 50S empêchant l'attachement des Amino-acyl-tRNA au site A de ribosome.</p> |

Tableau IV : Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique (Chopra & Roberts, 2001; Yala *et al.*, 2001; Gaynor & Mankin, 2005; Chaussade *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2016; Gallagher & MacDougall, 2016).

| Familles | Antibiotiques (exemples) | Spctre d'activité | Effet d'antibiotique | Mécanisme d'action |
|--------------------------|---|--|-------------------------|---|
| Polymyxines et colistine | Polymyxine β Polymyxine E (Colimycine®) | -Spctre d'activité étroit -Agit en particulier sur les bacilles à Gram négatif tel que <i>Pseudomonas</i> et les entérobactéries sauf <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> et <i>Providencia</i> | -Effet bactéricide | - Les polymyxines se lient à la membrane externe des bactéries à Gram négatif, entraînant à la perturbation de la stabilité de la membrane plasmatique et à la fuite du contenu cellulaire par formation de pores. |

I.2. La résistance aux antibiotiques

Au terme de six décennies d'utilisation des antimicrobiens, les bactéries pathogènes humaines et animales ont atteint des niveaux alarmants de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques.

I.2.1. Définition

La résistance aux antibiotiques est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se chevauchent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (Muylaert & Mainil, 2012).

A. Définition microbiologique

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une

propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions (Muylaert & Mainil, 2012).

B. Définition clinique

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. En outre, il est important de signaler, qu'en conditions *in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique, ainsi que l'état du système immunitaire de l'individu traité. Et nombreuses sont les situations où le composé ne pourra pénétrer ou agir au niveau du site infectieux, créant de la sorte un état de résistance clinique : citons pour exemples les abcès fibrotiques ou les conditions de pH ou de pression partielle en oxygène trop faibles (Muylaert & Mainil, 2012).

I.2.2. Types de résistance

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

A. La résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance intrinsèque fait référence à l'existence de gènes dans les génomes bactériens qui pourraient générer un phénotype de résistance, c'est-à-dire une proto- ou quasi-résistance (Davies & Davies, 2010). Elle se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens (Muylaert & Mainil, 2012).

La résistance bactérienne naturelle est permanente, d'origine chromosomique et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire. Elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce et délimite le spectre d'action des antibiotiques (Carle, 2009).

Cette résistance peut être due : à l'inaccessibilité à la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique (Carle, 2009), une expulsion de l'antibiotique par

des pompes à efflux chromosomiques ou encore une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (Muylaert & Mainil, 2012). Par exemple, la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramines, etc.) (Courvalin, 2008) et la production d'une β -lactamase AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae* entraîne la résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique (Muylaert & Mainil, 2012).

B. La résistance acquise

Contrairement à la résistance intrinsèque, il s'agit d'un caractère qui ne concerne que certaines souches de la même espèce ou du même genre (Lozniewski & Rabaud, 2010) ; dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90% des souches (Courvalin, 2008).

La résistance acquise est souvent instable, imprévisible, évolutive, se propage de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe ou qui tue les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski & Rabaud, 2010).

Deux phénomènes majeurs sont à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien : les mutations responsables des résistances endogènes et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gènes, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des β -lactamases ou qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de β -lactamines (Muylaert & Mainil, 2012).

I.2.3. Origine et support génétique de la résistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément génétique mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra-chromosomique) (Carle, 2009).

Les éléments génétiques mobiles se répartissent en deux types généraux :

1. Les éléments qui peuvent se déplacer d'une cellule bactérienne à une autre, ce qui, en termes de résistance aux antibiotiques, comprend les plasmides de résistance et les transposons de résistance conjugatifs.
2. Les éléments qui peuvent se déplacer d'un emplacement génétique à un autre dans la même cellule : les transposons de résistance, les cassettes de gènes et les intégrons.

Les plasmides et les transposons conjugatifs se transfèrent d'une cellule à l'autre par des mécanismes qui impliquent la réplication. Les transposons, les cassettes de gènes et le transfert de gènes médié par les séquences d'insertion entre des sites situés sur la même molécule d'ADN ou sur des molécules différentes nécessitent une certaine forme de recombinaison, qui peut ou non inclure également une certaine forme de réplication (**Bennett, 2008**).

I.2.4. Modalités de transfert génétique de la résistance

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à certains antibiotiques alors que d'autres bactéries normalement sensibles peuvent devenir résistantes.

Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène :

A. Evolution verticale

Le chromosome bactérien mute spontanément (mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries) (**Carle, 2009**). Ce phénomène rare et aléatoire (**Lozniewski & Rabaud, 2010**) n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action (**Carle, 2009**).

Dans ce cas, la résistance est soit transmise verticalement à la descendance lors de la division cellulaire, soit par transformation d'un fragment d'ADN vers une bactérie réceptrice compétente (**Abouelfadl, 2019**).

L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants (**Carle, 2009**).

B. Evolution horizontale

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles (**Carle, 2009**).

Les bactéries disposent de quatre méthodes pour transférer l'ADN d'une cellule à une autre (figure 02): la transformation, la transduction, la conjugaison et la transposition (Bennett, 2008).

B.1. La transformation bactérienne

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie a acquis dans son environnement proche. Cet ADN extracellulaire a été soit libéré par la lyse de cellules mortes ou de particules virales, soit excrété par des cellules viables. Pour parvenir à intégrer le fragment d'ADN, il est nécessaire que la bactérie se trouve dans un état physiologique particulier appelé « compétence » (Prescott *et al.*, 2003; Zaneveld *et al.*, 2008).

B.2. La transduction

La transduction est un phénomène qui a été mis en évidence par Zinder et Lederberg en 1952 chez *Salmonella typhimurium*. Elle consiste en l'acquisition de séquences d'ADN par la bactérie suite à une infection par un bactériophage (Prescott *et al.*, 2003; Zaneveld *et al.*, 2008).

B.3. La conjugaison

La conjugaison est considérée comme étant le mécanisme le plus important et le plus efficace intervenant dans les transferts horizontaux de gènes entre bactéries. Elle implique le transfert d'ADN entre deux cellules par l'intermédiaire d'un contact cellulaire initié par des pilis conjugatifs (Prescott *et al.*, 2003; Zaneveld *et al.*, 2008).

B.4. La transposition

Le chromosome de bactéries, de virus et de cellules eucaryotes contient des morceaux d'ADN qui se déplacent dans le génome. Ce déplacement est appelé « transposition ». La transposition est un mécanisme qui concourt à la dissémination efficace de déterminants de résistances dans les écosystèmes bactériens (Prescott *et al.*, 2003; Abouelfadl, 2019).

Selon le type de transposons impliqués (des entités génétiques qui se déplace de façon intra- ou intermoléculaire), deux types de transposition sont distingués: la transposition répllicative et non répllicative (Prescott *et al.*, 2003; Zaneveld *et al.*, 2008).

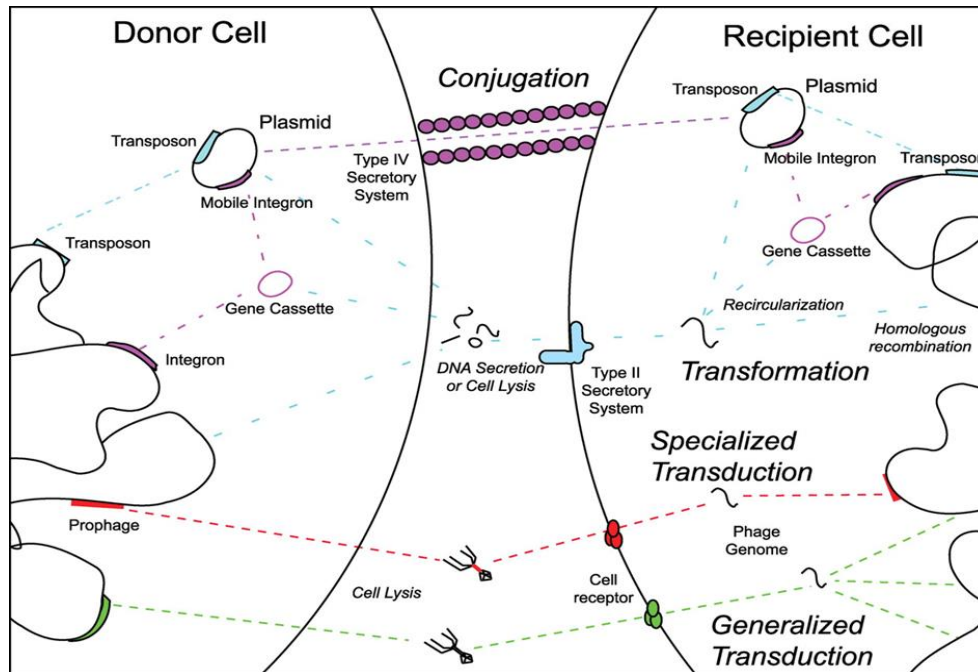


Figure 02 : Mécanismes inter et intracellulaires impliqués dans les transferts horizontaux de gènes (Zaneveld *et al.*, 2008).

I.2.5. Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

En réponse à la pression de sélection antibiotique, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes conférant la résistance à la bactérie hôte, ainsi que sa capacité de transmission à d'autres bactéries. Ces microorganismes combinent notamment des mécanismes à large spectre de substrats, qui leur permettent de résister simultanément à diverses classes d'antibiotiques et de devenir ainsi multirésistantes (Courvalin, 2008).

Les principaux mécanismes de la résistance acquise sont illustrés dans la figure 03 et mettent en jeu quatre grands types de stratégies, toutes sous contrôle génétique, à savoir :

1. La stratégie d'évitement : modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière.
2. La stratégie offensive : production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique.
3. La stratégie de contournement: l'antibiotique atteint sa cible et interagit avec elle mais la bactérie est capable d'utiliser d'autres voies métaboliques pour suppléer au manque d'activité de la cible primaire.
4. La stratégie de la protection physique soit par :
 - Imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif.

- Efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes (Mesaros *et al.*, 2005; Courvalin, 2008).

Le motif commun à ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible (Courvalin, 2008).

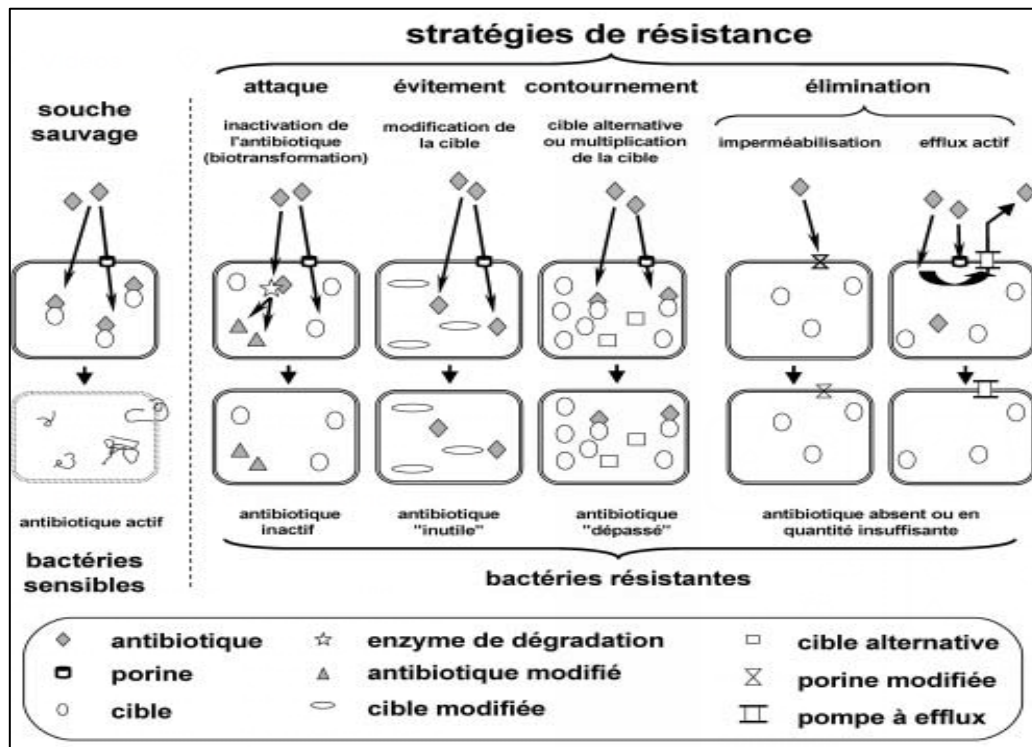


Figure 03 : Principales stratégies mises en place par les bactéries pour résister à l'action des antibiotiques (Mesaros *et al.*, 2005).



Chapitre II:

*La résistance des bacilles à Gram négatif
aux carbapénèmes*

II. La résistance des bacilles à Gram négatif aux carbapénèmes

II.1. Bacilles à Gram négatif

Les bacilles à Gram négatif (BGN) occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance est liée à la variété des espèces bactériennes qui les composent ainsi à leur multirésistance aux antibiotiques actuellement disponibles.

Généralement, ils sont subdivisés en deux grands groupes : les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-NF) (**Liassine, 2000**).

Parmi ces grands groupes, notre étude ne porte que sur certains genres et espèces présentant un intérêt médical, voir même une pathogénicité potentielle, à savoir :

- Du groupe des entérobactéries :
 - *Escherichia coli*.
 - *Shigella*.
 - *Salmonella*.
 - *Citrobacter*.
 - *Klebsiella*.
 - *Enterobacter*.
 - *Proteus*.
- Du groupe des BGN-NF :
 - *Pseudomonas aeruginosa*.
 - *Acinetobacter baumannii*.

II.1.1. Sources et modes de transmission

Les bacilles à Gram négatifs ont un habitat très varié. Certaines espèces sont strictement humaines, d'autres humaines et animales, voire à dominante animale, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel; d'autres, enfin, ont pour réservoir principal le milieu extérieur essentiellement hydrique, à l'état libre ou associé à des amibes (**Denis et al., 2016**).

Leur transmission peut se faire, selon les espèces, par simple contact, par morsure, griffure ou piqure, par ingestion, par inhalation, etc. (**Denis et al., 2016**).

Le tableau V illustre les différents réservoirs et modes de transmission des bacilles à Gram négatifs.

Tableau V : Sources et modes de transmission des bacilles à Gram négatifs (Hart & Shears, 1997 ; Denis *et al.*, 2016).

| Organisme | Réservoir | | | Transmission | | | |
|---|-----------|--------|---------------|--------------|---------|---------|-------------|
| | Homme | Animal | Environnement | Oro-fécale | Aérosol | Directe | Nosocomiale |
| Les entérobactéries | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | - | + | + |
| <i>Shigella</i> | + | - | - | + | - | + | - |
| <i>Salmonella</i> | + | V | + | + | - | + | - |
| <i>Citrobacter</i> | + | + | + | + | - | + | + |
| <i>Klebsiella</i> | + | + | + | V | + | + | + |
| <i>Enterobacter</i> | + | + | + | + | - | + | + |
| <i>Proteus</i> | + | + | + | - | - | - | + |
| Les bacilles à Gram négatifs non fermentaire | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | - | + | - | + | + | + |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | + | + | + | - | + | + | + |

+ : Présence, - : Absence, V : Variable selon l'espèce.

II.1.2. Pouvoir pathogène

Les pathologies dues aux bacilles à Gram négatif sont très diverses et si certaines espèces ont une spécificité syndromique méningée, entérique, génitale, septicémique, endocardique, etc., d'autres ont un spectre pathogène très large. Ces pathologies peuvent être isolées ou survenir dans un contexte épidémique nécessitant parfois de véritables enquêtes (Denis *et al.*, 2016).

Les bacilles à Gram négatif sont des causes courantes d'infections intra-abdominales (IAI), d'infections urinaires (UTI), de pneumonie sous ventilation (PAV) et de bactériémie (tableau VI) (Kaye & Pogue, 2015).

Tableau VI : Principales infections dues aux bacilles à Gram négatif (Hart & Shears, 1997; Lambert, 2016).

| Organisme | Principales infections |
|---|---|
| Les entérobactéries | |
| <i>Escherichia coli</i> | Infection urinaires et de plaie, septicémies, méningites néonatales, gastroentérites |
| <i>Shigella</i> | Dysenterie bacillaire et gastroentérites |
| <i>Salmonella</i> | Fièvre typhoïde, fièvres paratyphoïdes, gastroentérites, septicémies et ostéomyélites |
| <i>Citrobacter</i> | Infections urinaires et de plaie, septicémies |
| <i>Klebsiella</i> | Infections urinaires, pneumopathies et septicémies |
| <i>Enterobacter</i> | Infections urinaires et de plaie, septicémies |
| <i>Proteus</i> | Infections urinaires et de plaie, septicémies |
| Les bacilles à Gram négatifs non fermentaire | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Infections urinaires et de plaie, septicémies et pneumopathies |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Infections urinaires, de plaie et de l'arbre respiratoire, bactériémies, pleurésies, péritonites chez les dialysés, méningite |

II.1.3. Caractères d'identification

Les principales caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques, enzymatiques et antigéniques des bacilles à Gram négatif sont illustrées et résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Principales caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques, enzymatiques et antigéniques des bacilles à Gram négatif (Hart & Shears, 1997; Avril *et al.*, 2000; Denis *et al.*, 2016) .

| | Les entérobactéries | | | | | | | Les bacilles à Gram négatif non fermentaires | |
|--|--|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------------|--|--------------------------------|
| Principaux genres et espèces impliqués en pathologie humaine | <i>Escherichia coli</i> | <i>Shigella</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Citrobacter</i> | <i>Klebsiella</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Proteus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| Les caractères morphologiques | | | | | | | | | |
| Forme | Bâtonnet | | | | | | | | |
| Gram | Négatif | | | | | | | | |
| Taille | Entérobactéries : 2 à 4 microns de long sur 0,4 à 0,6 microns de large <i>A. baumannii</i> : 0,9 à 1,6 µm de diamètre sur 1,5 à 2,5 µm de longueur <i>P. aeruginosa</i> : 0.5 à 0.8 µm de diamètre sur 1 à 3 µm de long | | | | | | | | |
| Ciliature | Péritriche | | | | | | | Polaire | - |
| Mobilité | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| Capsule | V | - | - | - | + | - | - | Pseudo-capsule | - |
| Spore | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Les caractères cultureux | | | | | | | | | |
| Température de croissance (°C) | 35±2 et à 44 | 35±2 | 35±2 | 35±2 | 35±2 | 35±2 | 35±2 | 30±7 42 | 41±3 |
| Temps d'incubation (h) | 18 -24 | | | | | | | 24 - 48 | 16 - 24 |
| Type respiratoire | AAF | AAF | AAF | AAF | AAF | AAF | AAF | AS | AS |
| Milieux de cultures | Milieux ordinaires, lactosés comme : Mac Conkey, Drigalski et EMB, gélose au sang cuit et au sang frais, Mueller Hinton pour antibiogramme | | | | | | | | |

| Les caractères enzymatiques et biochimiques | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Catalase | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxydase | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| RN | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| ONPG | + | V | - | + | + | + | - | - | - |
| H ₂ S | - | - | + | V | - | - | V | - | - |
| VP | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Indole | + | V | - | - | V | - | V | - | - |
| Urée | - | - | - | - | + | - | + | V | - |
| Citrate | - | - | V | + | + | + | V | + | + |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Lactose | + | - | - | + | + | + | - | - | - |
| LDC | V | - | + | - | V | V | - | - | - |
| ODC | V | V | V | V | - | + | V | - | - |
| ADH | - | - | V | - | - | V | - | + | - |
| Production de gaz | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| Les caractères antigéniques | | | | | | | | | |
| Ag O (Somatique) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ag H (Flagellaire) | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| Ag K (Capsulaire) | + | - | + | + | + | - | - | + | + |
| Ag Kunin (Commun) | + | + | + | + | + | + | + | - | - |

+ : Caractère positif, - : Caractère négatif, V: Variable selon l'espèce

AS : Aérobie Stricte, AAF : Aéro-Anaérobie Facultatif.

II.2. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des antibiotiques revêtant une importance cruciale dans l'arsenal thérapeutique chez l'homme (Wolff *et al.*, 2008). Ils sont considérés comme le groupe d'agents antimicrobiens le plus puissant avec une efficacité prouvée dans le traitement des patients souffrant d'infections bactériennes graves (Touati & Mairi, 2020).

II.2.1. Définition

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques naturels ou semi-synthétiques obtenus à partir de *Streptomyces cattleya*, un micro-organisme du sol dont les colonies rappellent une espèce d'orchidée du même nom (Wolff *et al.*, 2008).

Ils représentent une classe puissante des β -lactamines, souvent utilisées pour traiter de nombreuses infections nosocomiales, en particulier celles liées aux espèces de bacilles à Gram négatif les plus fréquentes que sont : les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Nordmann, 2010).

II.2.2. Structure chimique et classification

Les carbapénèmes possèdent un cycle β -lactame et partagent le même mécanisme d'action que les β -lactamines, mais ils sont structurellement uniques et diffèrent à la fois des pénicillines et des céphalosporines (Gallagher & MacDougall, 2016). Ils se distinguent des pénicillines (pénams) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3, également présente sur les céphalosporines (figure 04) (Wolff *et al.*, 2008).

Les carbapénèmes comprennent quatre molécules actuellement disponibles sur le marché:

- L'imipénème : un dérivé stable de la thiénamycine commercialisé depuis 1986 sous le nom (Tiénam®). Il est co-administré avec cilastatine pour éviter à la fois sa dégradation par la déshydropeptidase (DHP-1) des tubules rénaux proximaux et pour lutter, d'autre part, contre la néphrotoxicité naturelle de cette molécule en elle-même.
- Le méropénème : mis sur le marché en 1997 (Méronem®). Il est largement utilisé dans l'Europe et en Amérique du Nord.
- L'ertapénème (Invanz®) depuis 2002.
- Le doripénème (Doribax®), commercialisé en France en mars 2009 (Grall *et al.*, 2011).

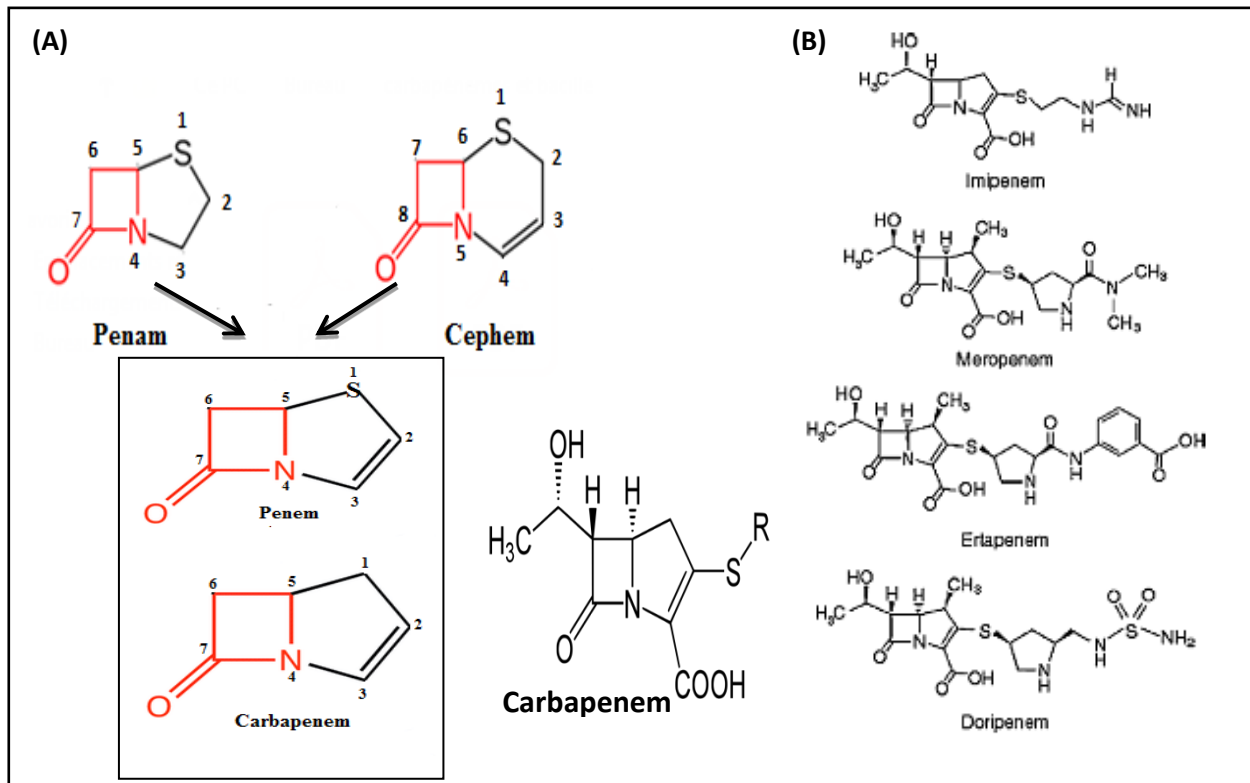


Figure 04 : Structures des carbapénèmes. (A) : Structure générale. (B) : Structures chimiques (Wolff *et al.*, 2008).

II.2.3. Effet et spectre d'action

Comme toutes les β -lactamines, les carbapénèmes exercent un effet bactéricide temps dépendant (Wolff *et al.*, 2008) et ont, pour la plupart, un très large spectre d'activité *in vitro* contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et anaérobies (Grall *et al.*, 2011).

Les quatre molécules de carbapénèmes restent en particulier actives sur les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et/ou de céphalosporinases de haut niveau. La différence la plus notable concerne l'ertapénème, dont l'activité sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* est trop limitée pour une utilisation clinique (Grall *et al.*, 2011).

En revanche, les carbapénèmes sont tous inefficaces sur *Stenotrophomonas maltophilia* (production naturelle d'une métallo- β -lactamase) et les staphylocoques résistants à la méticilline. Concernant les entérocoques, aucun carbapénème n'est actif sur *Enterococcus faecium*, et seul l'imipenème conserve une certaine activité vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis* (Grall *et al.*, 2011).

II.2.4. Mécanisme d'action et activité in vitro

Les carbapénèmes exercent leur activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines de liaison des pénicillines (PLP). Contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se lient principalement à la PLP3, les carbapénèmes ont pour cibles privilégiées les PLP1a,1b et 2, avec pour conséquence une lyse sans filamentation préalable et une moindre libération d'endotoxine par les bacilles à Gram négatif (Wolff *et al.*, 2008; Grall *et al.*, 2011).

Leur activité est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises, y compris les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) de type TEM1, SHV2, CTX-M3 et les céphalosporinases codées par des gènes chromosomiques ou des gènes plasmidiques (Nordmann, 2010).

II.3. La résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien, observé dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était initialement faible (Lozniewski & Rabaud, 2010). Ce phénomène d'évolution naturelle, accentué par l'application erronée des antibiotiques (Kon & Rai, 2016), a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques (Lozniewski & Rabaud, 2010).

L'émergence continue de souches bactériennes résistantes, en particulier, les souches multirésistantes d'*Enterobacteriaceae* (notamment *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*), de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* constitue une menace sérieuse pour la santé publique mondiale en raison :

1. Des options de traitement limitées disponibles.
2. Du rythme historiquement lent de développement de nouveaux agents antimicrobiens (Cerceo *et al.*, 2016).

Ces deux facteurs contribuent à l'augmentation de la mortalité des patients. La limitation de la propagation des souches multirésistantes est considérée donc comme une priorité en matière de lutte contre les infections (Woodford *et al.*, 2011).

II.3.1. Les mécanismes de résistance

De même que pour les autres β -lactamines, des résistances aux carbapénèmes sont apparues et conduisent parfois à des impasses thérapeutiques (Grall *et al.*, 2011). Cette résistance, en évolution perpétuelle, résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous les deux des β -lactamases (Tani & Arlet, 2014).

Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique, plasmidique, ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines (Tani & Arlet, 2014).

Le second est lié à l'expression de carbapénémases : β -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes et parmi les enzymes les plus importantes d'un point de vue clinique car elles compromettent l'efficacité de presque toutes les β -lactamines (Tani & Arlet, 2014).

A. Association de mécanismes

Contrairement à *A. baumannii*, chez qui la production de carbapénémases est le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu, chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*, la résistance aux carbapénèmes est majoritairement due à des associations de mécanismes de résistance, associant fréquemment l'hyperproduction d'une céphalosporinase et/ou BLSE à un déficit ou une altération des porines (Grall *et al.*, 2011).

Trois types d'associations peuvent avoir lieu :

A.1. Imperméabilité membranaire et expression de β -lactamases (AmpC et/ou BLSE) chez les entérobactéries

La résistance au carbapénème des entérobactéries a été extrêmement lente à apparaître même après 20 ans d'utilisation de l'imipénème (Livermore & Woodford, 2006). Elle a d'abord été décrite chez des espèces d'entérobactéries qui produisent naturellement des céphalosporinases chromosomiques à bas niveau inductibles (Nordmann, 2010).

La surexpression de ces céphalosporinases chromosomiques de classe C et/ou production de BLSE, associée à une modification de perméabilité de la membrane externe (diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines de type OmpC, OmpF, OmpD et OmpK 35/36 : protéines transmembranaires impliquées dans le passage sélective des nutriments, dont les antibiotiques), a été à l'origine, de la résistance immédiate aux carbapénèmes et autres β -lactamines que l'on avait observée chez *Enterobacter sp.* puis chez

Serratia sp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* (Nordmann, 2010; Dortet et al., 2013).

Pareillement, ce phénotype de résistance composite a été observé ainsi chez des souches ayant acquis une céphalosporinase plasmidique et productrices de BLSE comme : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella* spp. (Grall et al., 2011; Dortet et al., 2013).

Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité à la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a. Cependant, ce type de mécanisme reste très rare chez cette espèce bactérienne (Grall et al., 2011).

A.2. Surexpression d'efflux actif (complexe MEX AB/OprM) associée à une perte de porine OprD ou hyperproduction de la céphalosporinase AmpC chez *Pseudomonas aeruginosa*

La résistance aux carbapénèmes n'est pas inhabituelle chez cette espèce. Elle est intrinsèquement résistante à l'ertapénème (Woodford et al., 2011).

Plusieurs mécanismes contribuent à cette résistance, à savoir, la surproduction d'une céphalosporinase chromosomique AmpC ou de céphalosporinases à spectre étendu (ESAC), la perte de la porine OprD propre aux carbapénèmes (résistance à l'imipénème) et la surexpression des mécanismes d'efflux actif, de complexe MexA–MexB–OprM (résistance au méropénème et au doripénème) (Wolff et al., 2008 ; Rodríguez-Martínez et al., 2009).

Ces mécanismes sont responsables d'une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et doivent être combinés pour produire une véritable résistance (Wolff et al., 2008).

A.3. Surexpression du système d'efflux AdeABC associé à l'expression d'oxacillinases, perte de la PLP2 et de la porine CarO chez *Acinetobacter baumannii*

Bien que le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus répandu chez *A. baumannii* corresponde à l'acquisition de carbapénémases, ou à l'hyper-expression de l'OXA- 51 chromosomique, des mécanismes de résistance non enzymatiques existent (Grall et al., 2011).

La résistance à l'imipénème et au méropénème chez cette souche requiert la perte de la porine CarO et d'une autre protéine de 43kDa (OprD-like) (Pleg et al., 2008).

Par ailleurs, la surexpression du système d'efflux A de ABC associée à la présence de certaines oxacillinases et/ou à la diminution d'expression voir la perte de la PLP2 semble être une source de résistance aux carbapénèmes (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011).

La résistance aux carbapénèmes par association de mécanismes est un phénomène :

- Peu inquiétant en cas d'une céphalosporinase chromosomique car non transmissible et s'observe chez de souches présentant généralement moins de résistances aux autres familles d'antibiotiques (Grall *et al.*, 2011).
- Inquiétant et alarmant en cas d'une céphalosporinase plasmidique, en raison de sa présence chez de souches résistantes à d'autres antibiotiques (aminosides, tétracycline, sulfamides, etc.) et sa possibilité de transmission horizontale (Nordmann, 2010).
- Qui inactive facilement l'ertapénème lorsque une BLSE (ex : CTX-M15) ou céphalosporinase s'est associé à un mécanisme d'imperméabilité ou d'efflux (Dortet *et al.*, 2013).

B. Les carbapénémases

La résistance enzymatique des bacilles à Gram négatif aux carbapénèmes est liée à la production de carbapénémases, une famille très composite d'enzymes hydrolytiques capables d'hydrolyser le cycle β -lactame des β -lactamines, définie sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse d'au moins un carbapénème disponible) et non sur une base structurale (Grall *et al.*, 2011) entraînant des CMI élevées des carbapénèmes (Queenan & Bush, 2007).

Ces dernières peuvent être de classe A (principalement des enzymes KPC), de la classe B ou des métallo- β -lactamases (MBL), principalement du VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), du NDM (New delhi metallo- β -lactamase) et dans une moindre mesure de l'IMP (imipenemase), et de la classe D (principalement du type OXA-48 chez les entérobactéries et OXA-23, OXA-24 / -40 et de type OXA-58 chez *Acinetobacter spp.*) (Albichr *et al.*, 2020). Toutes ces β -lactamases sont de détection difficile et peuvent contribuer à la multirésistance, source d'impasses thérapeutiques (Wolff *et al.*, 2008).

II.3.2. Classification et propriétés des carbapénémases

Les carbapénémases identifiées chez les BGN appartiennent aux 3 classes connues de β -lactamases : classes A, B et D de la classification de Ambler (tableau VIII) (Tani & Arlet, 2014).

Les β -lactamases des classes A et D utilisent une sérine comme centre actif enzymatique, tandis que les β -lactamases de classe B utilisent le métal zinc.

A. La classe A

Les carbapénèmases de la classe A sont codées sur des plasmides et sont le plus fréquemment détectées chez *P. aeruginosa* et *Klebsiella* (Sawa *et al.*, 2020).

Il existe trois carbapénèmases principales qui appartiennent à la classe A d'Ambler : les enzymes de types NmcA (*non-metallo carbapenemase A*) et IMI (*imipenem hydrolysing β -lactamase*), celles de type SME (*Serratia marcescens enzyme*) et, majoritairement, celles de type KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (Dortet *et al.*, 2013).

Toutes ces enzymes possèdent un site actif impliquant une sérine en position 70 et sont capables d'hydrolyser une grande variété de β -lactamines, dont les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes. Leur activité hydrolytique est partiellement inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam (Dortet *et al.*, 2013).

Un quatrième groupe d'enzymes correspondant aux β -lactamases de type GES (*Guyana extended-spectrum*) comprend quelques représentants possédant une faible activité carbapénèmase (Dortet *et al.*, 2013).

B. La classe B

Les métallo- β -lactamases (M β L) sont des enzymes dont :

1. Le site actif fait intervenir un ou deux ions Zn^{2+} .
2. Les gènes sont situés sur un intégron, un transposon, un plasmide, un chromosome ou diverses autres molécules génétiques (Sawa *et al.*, 2020).

Ces enzymes hydrolysent efficacement la majorité des β -lactamines dont les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes, à l'exception de l'aztréonam. D'autre part, les M β Ls sont inhibées par les chélateurs des ions divalents tels que l'EDTA, mais ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Dortet *et al.*, 2013).

Jusque récemment, les M β Ls les plus fréquemment identifiées appartenait à la famille de VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) et IMP (*imipenemase*). Décrites fin 2008, les M β Ls de la famille de NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) sont largement disséminé dans le monde entier. Les M β Ls de type KHM-1 (*Kyorin Health Sciences metallo- β -lactamase*) et GIM-1 (*German imipenemase*) ont été décrites beaucoup plus rarement chez les entérobactéries (Dortet *et al.*, 2013).

C. La classe D

Les β -lactamases de classe D d'Ambler, ou OXA pour « oxacillinases », forment une famille composées de 790 variantes, dont un faible nombre possède une activité carbapénémase. Ce type de β -lactamases est fréquemment codé sur des plasmides et / ou des intégrons permettant leur large diffusion (Sawa *et al.*, 2020).

Les oxacillinases à activité carbapénémase n'hydrolysent pas ou très peu les céphalosporines à large spectre (céfotaxime, ceftazidime, céfépime) et l'aztréonam, à l'exception du variant OXA-163 dont l'activité carbapénémase est très réduite. L'activité carbapénémase de ces enzymes est faible, et elle n'est inhibée ni par les inhibiteurs commerciaux de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam), ni par l'EDTA. En revanche, cette activité peut être inhibée *in vitro* par le NaCl (Dortet *et al.*, 2013).

La majorité des variantes d'oxacillinases à activité carbapénémase ont été trouvées sur les chromosomes des souches d'*Acinetobacter baumannii*, mais OXA-23 et OXA-48 ont été rapportées sur des plasmides isolés de bactéries entériques (Sawa *et al.*, 2020).

Tableau VIII : Caractéristiques des principales carbapénémases acquises chez les bacilles à Gram négatif (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011; Dortet *et al.*, 2013).

| Classification d'Ambler | Enzymes | Espèces | Hydrolyse | Inhibition |
|--------------------------|---------------------------------------|--|---|--|
| Classe A | KPC, GES, IMI NMC, SME | Entérobactéries <i>P. aeruginosa</i> | Toutes les β -lactamines | +/- Tazobactam et l'acide clavulanique |
| Classe B (MBL) | NDM, VIM, IMP, GIM, SPM | Entérobactéries <i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> | Toutes les β -lactamines (sauf aztréonam) | Chélateurs des ions divalents (EDTA) |
| Classe D (Oxacillinases) | OXA-48 et dérivées OXA-163, OXA-23 | Entérobactéries <i>A. baumannii</i> | Pénicillines, +/- carbapénèmes et pas d'action sur les C3G/C4G | - |

+/- : Plus ou moins (partielle) ; **C3G** : Céphalosporines de 3ème génération ; **C4G** : Céphalosporines de 4ème génération.



Chapitre III:

*Détection des bacilles à Gram négatif
résistants aux carbapénèmes*

III. Détection des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

III.1. Présentation de l'étude

Notre étude prévue être réalisée au sein du Centre Hospitalo-Universitaire Nedir Mohamed, Tizi-Ouzou devait porter sur :

1. La recherche des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes essentiellement dans la flore fécale ainsi que dans d'autres prélèvements cliniques des patients admis dans différents services à savoir : oncologie, réanimation (médicale et chirurgicale) et infectiologie.
2. L'évaluation du degré de contamination de l'environnement hospitalier au sein des services cités précédemment par les bacilles à Gram négatif multirésistants.

Vu la situation mondiale stressante due à l'ampleur et aux conséquences du COVID-19, difficiles à concevoir, notre étude n'a pas été accompli. Pour cela et afin de développer ces objectifs, nous avons opté pour ce présent chapitre dans lequel nous allons essayer de décrire la démarche générale à poursuivre en se basant sur des travaux antérieurs et données bibliographiques.

La méthodologie adoptée est comme suit :

- Recueil de données.
- Isolement et identification des bacilles à Gram négatif à partir des prélèvements rectaux et à partir des surfaces de l'environnement hospitalier.
- Etude de la sensibilité de ces souches vis-à-vis de différentes classes d'antibiotiques.
- Détection des phénotypes de résistance aux carbapénèmes par différentes méthodes (phénotypiques et moléculaires).

III.2. Recueil de données

Comme notre étude s'agit d'un travail visé la prévention des épidémies dans les services hospitaliers, notamment les services à haut risque, et non pas visé le diagnostic c'est-à-dire : rechercher les bacilles à gram négatif résistants aux carbapénèmes comme portage et non pas comme source d'infection, un questionnaire (annexe I) doit être rempli à la fin de chaque prélèvement réalisé afin de recueillir le maximum de données en vue de comprendre et d'expliquer les faits : origine et diffusion de la résistance de façon épidémique en milieu hospitalier.

III.3. Prélèvements

Deux types de prélèvement ont été programmés dans 03 services : oncologie, réanimation (médicale et chirurgicale) et infectiologie.

La forte incidence en bactéries multirésistantes (BMR) en raison de la prescription importante d'antibiotiques induisant la pression de sélection, la technicité développée, les procédures invasives et la charge importante en soins justifie le choix de ces services.

III.3.1. Prélèvement rectal

Avant l'implication directe des patients dans la conception et la réalisation de l'étude, tous les patients doivent être informés du but de l'étude et des conséquences d'un résultat positif (**Pérez et al., 2019**).

Les prélèvements rectaux de dépistage par écouvillonnage sont obtenus après consentement verbal de tous les patients, à deux moments différents : à l'admission et à la sortie (**Pérez et al., 2019**). Ils peuvent être exécutés par des agents de santé expérimentés ou par le patient lui-même.

La procédure de prélèvement du spécimen sur écouvillon rectal (figure 05) se réalise comme suit :

1. Se laver les mains.
2. Ouvrir partiellement l'emballage de l'écouvillon et retirer l'écouvillon humidifié au sérum physiologique ou à l'eau stérile.
3. Tenir l'écouvillon dans la main en plaçant le pouce et l'index au milieu de la tige de l'écouvillon sur la ligne de cassure.
4. Insérer délicatement l'écouvillon dans le rectum environ 3-5 cm au-delà de la marge anale (l'extérieur de l'anus) et tourner délicatement l'écouvillon pendant 5 à 10 secondes puis retirer le sans toucher la peau.
5. Tout en tenant l'écouvillon dans la même main, dévisser le bouchon du tube.
6. Placer immédiatement l'écouvillon dans le tube de transport de sorte que la ligne de cassure (ligne noire) soit en haut du tube.
7. Casser délicatement la tige de l'écouvillon au niveau de la ligne de cassure contre la paroi du tube.
8. Jetez immédiatement la partie supérieure de la tige de l'écouvillon.
9. Vissez hermétiquement le bouchon sur le tube.

L'écouvillon humidifié doit être visuellement chargé de matières fécales, dans le cas contraire, il convient de demander un nouveau prélèvement (HPCi, 2017).

Tous les prélèvements recueillis des différents services doivent être étiquetés et acheminés immédiatement au laboratoire de microbiologie.

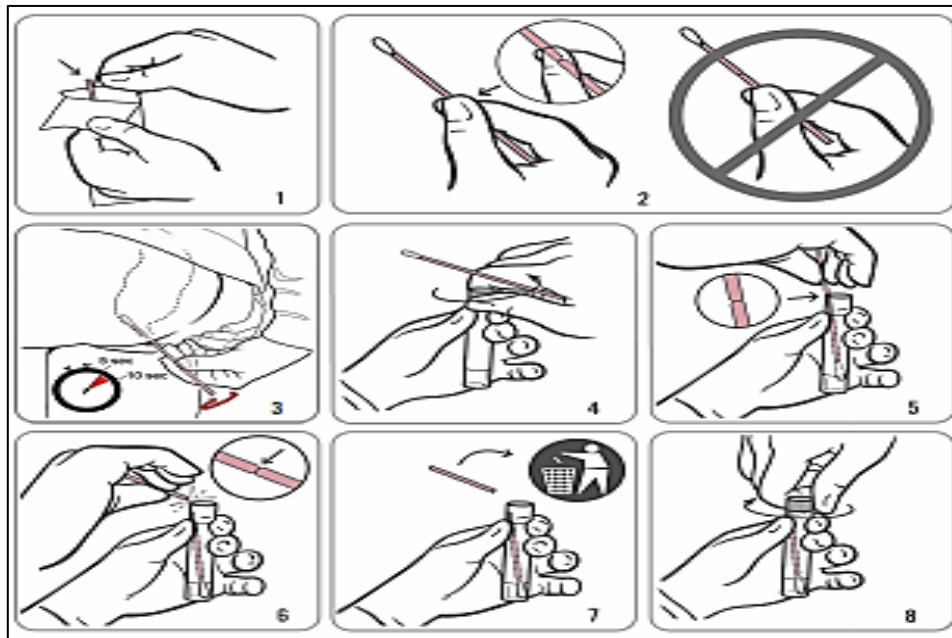


Figure 05 : Ecouvillonnage rectal : mode opératoire (Hologic Aptima).

III.3.2. Prélèvement de surface

A. Où et à quel moment prélever ?

Les prélèvements de surface doivent s'effectuer le matin avant le nettoyage et/ou la désinfection quotidienne dans différents sites choisies en fonction de leurs fréquences de contact avec les patients, le personnel et les visiteurs (Le Gallou & Lepelletier, 2017).

Les points de prélèvement prévus ciblés sont ainsi :

- Surfaces sèches : literies, poignées, placards, tables, etc.
- Surfaces humides : lavabos, robinets, portes savon, etc.
- Dispositifs médicaux : respirateurs, sondes urinaires, matériel chirurgical etc.

B. Identification du prélèvement

Tous les échantillons doivent être clairement identifiés au moment du prélèvement et comportant au moins les informations suivantes :

- Site de prélèvement (service, localisation exacte du point).
- Date et heure de réalisation.

- Technique adoptée et matériel utilisés.
- Toute information concernant les conditions de réalisation susceptible d'être utile à l'interprétation (après bionettoyage, au repos ou en activité, hors ou en présence humaine, etc.) (Le Gallou & Lepelletier, 2017).

C. Technique par écouvillonnage

1. Au préalable, se laver ou se désinfecter les mains.
2. Sortir l'écouvillon de son emballage stérile et humidifier le par un liquide stérile (sérum physiologique ou diluant-neutralisant).
3. En respectant un angle de 45° et avec une pression constante, frotter sur la surface à prélever (approximativement de 25 cm²) par des stries parallèles rapprochées, tout en faisant tourner l'écouvillon entre le pouce et l'index, dans deux directions perpendiculaires l'une par rapport à l'autre (figure 06).
4. Mettre l'écouvillon dans le tube et rompre le bâtonnet dans des conditions aseptiques.

Les écouvillons recueillis et protégés par leur fourreau, doivent être transportés rapidement au laboratoire à température ambiante pour éviter la dessiccation (Le Gallou & Lepelletier, 2017).

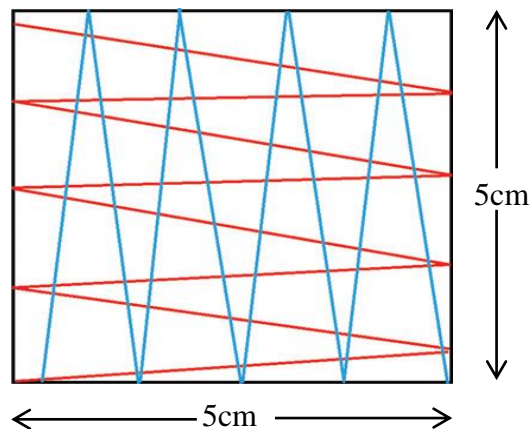


Figure 06 : Schéma de prélèvement de surface à l'écouvillon (Le Gallou & Lepelletier, 2017).

III.4. Isolement et purification

La composition des milieux de culture à utiliser sont donnés dans l'annexe II.

Comme le sérum physiologique est un milieu usuel utilisé pour le transport et le pré-enrichissement des bactéries c'est-à-dire : empêche la dessiccation, permet la revivification et garde la vitalité des bactéries sans qu'il y est croissance, l'ensemble des prélèvements (rectaux et de surfaces) récupérés des différents services doivent être transférés dans des tubes de bouillons nutritifs additionnés du méropénème à raison de 0,5 mg/L+ vancomycine à 16

mg/L puis incubés à 37 °C pendant 24h pour augmenter la chance de prolifération sélective des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes.

❖ **Après incubation de 24h**

L'isolement se fait à partir des bouillons nutritifs positifs à l'aide de pipettes Pasteur ou une anse de platine sur gélose Mac Conkey additionné avec les mêmes concentrations d'antibiotique (méro pénème à raison de 0,5 mg/L + vancomycine à 16 mg/L) avec une incubation à 37 °C pendant 24h.

L'inaccessibilité de la vancomycine à la paroi des bactéries à Gram négatif en raison de son poids élevé ainsi son spectre d'action limité aux Gram positif, justifie son utilisation en milieu de culture pour inhiber les bactéries Gram positives sans y affecter la croissance de celles à Gram négatif. Par ailleurs, l'utilisation du méro pénème dans le milieu permet uniquement la sélection de bactéries résistantes aux carbapénèmes. Il s'agit donc d'un isolement sélectif.

❖ **Après incubation de 48h à 72h**

Après 24h d'incubation, une lecture de boîtes doit être réalisée par observation macroscopique des colonies ayant poussées sur le milieu.

Selon l'aspect et la couleur des colonies, deux types de colonies peuvent être obtenus :

- Colonies roses/rouges : acidification du milieu par fermentation du lactose = lactose ⁺.
- Colonies incolores ou jaunes : pas d'acidification du milieu = lactose ⁻.

La lecture sur milieu Mac Conkey est résumée dans le tableau IX.

Tableau IX : Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey (Hart & Shears, 1997).

| Microorganismes | Aspect de colonies sur milieu Mac Conkey |
|--------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | Couleur rose à rose-rouge, (colonies parfois cernées par une zone de précipitation biliaire) |
| <i>Enterobacter</i> | Aspect muqueux, colonies de couleur rose |
| <i>Klebsiella</i> | Aspect muqueux, colonies de couleur rose |
| <i>Proteus</i> | Colonies transparentes, essaimage inhibé |
| <i>Salmonella</i> | Colonies transparentes |
| <i>Shigella</i> | Colonies transparentes |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Colonies irrégulières, transparentes à roses |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | De petites colonies de 1mm de diamètre, transparentes |

Si la culture est polymicrobienne, des repiquages successifs doivent être réalisés afin de purifier les isolats. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24h.

N.B.

En plus des isolats des prélèvements rectaux et de surfaces, des isolats des entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* isolées à partir d'autres prélèvements cliniques (ECBU, hémoculture, coproculture etc.) sont prévus être recueillis.

III.5. Identification

L'identification présomptive des isolats se fait sur la base des caractéristiques culturales sur gélose Mac Conkey (fermentation du lactose et la coloration des colonies) associée à l'examen direct par coloration de Gram complétée par des tests biochimiques complémentaires : la recherche d'une catalase et oxydase, test uréase, test d'utilisation de citrate, test TDA, test VP et la recherche des décarboxylases : LDC, ODC et ADH. Ces tests peuvent être effectués sur galerie biochimique classique en cas de disponibilité (annexe III) (Denis *et al.*, 2016).

Le non-respect strict de cette procédure expose à des erreurs d'identifications.

III.6. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en routine s'effectue grâce à la technique de l'antibiogramme.

III.6.1. Principe général

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier pré-imprégné (Denis *et al.*, 2016).

La diffusion de l'antibiotique se fait de façon radiale à partir du disque de papier selon un gradient de concentration décroissant. Après 16 à 24 heures d'incubation à environ 35 °C, une zone d'inhibition centrée sur le disque se forme ; la concentration d'antibiotique en bordure de la zone d'inhibition correspond à la CMI de l'antibiotique pour la bactérie étudiée (Denis *et al.*, 2016).

Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres soit manuellement à l'aide d'un pied à coulisses, soit grâce à des systèmes automatisés de lecture (Denis *et al.*, 2016). La gélose utilisée est Mueller-Hinton (MH) et son épaisseur doit être d'environ 4 mm.

Sa composition est importante car des modifications de composition peuvent avoir des conséquences sur le résultat des tests de sensibilité pour certains antibiotiques (**Denis et al., 2016**).

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables, le comité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie (**CA-SFM/EUCAST**) a standardisé cette technique:

- L'inoculum doit correspondre à une suspension bactérienne de 0,5 McFarland (soit 1 à 2.10^8 UFC/ml) et doit être calibré afin d'obtenir des colonies confluentes.
- L'ensemencement de la gélose doit être réalisé par écouvillonnage (manuellement dans trois directions différentes ou à l'aide d'un ensemenceur rotatif).
- Les géloses ensemencées doivent être incubées à environ 35 °C pendant 16 à 24 h en position renversée (couvercle en bas) en aérobiose, sous 4 à 6% de CO₂ ou en microaérophilie en fonction des germes ciblés.

III.6.2. Manipulation

A. Inoculum

Pour avoir un inoculum d'opacité équivalente à 0,5 McFarland (environ 10^8 bactéries/ml), prélever 4 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture pure sur milieu d'isolement à l'aide d'une anse de platine, puis dissocier les dans 10 ml d'eau physiologique stérile et homogénéiser bien jusqu'à l'obtention d'un trouble.

B. Ensemencement

- Immerger un écouvillon stérile dans le tube afin de prélever une quantité de suspension bactérienne, puis déposer le à la périphérie de la boîte de pétrie contenant le milieu MH.
- Ensemencer la suspension prélevée sur toute la surface du milieu en faisant des stries très serrés.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Comblés les vides formés à la périphérie de la boîte après l'ensemencement en faisant un tour par l'écouvillon sur les bords de la boîte.
- Déposer les disques d'antibiotiques à tester sur la surface de la gélose, puis incubé les boîtes à 35 °C pendant 24h.

La liste des antibiotiques à tester pour les entérobactéries ainsi pour *Pseudomonas* et *Acinetobacter* est donnée en annexe IV.

C. Lecture des résultats et interprétation

Les bactéries durant l'incubation vont se développer et les disques d'antibiotiques vont quant à eux diffuser l'antibiotique, plus on s'écarte des disques moins l'antibiotique est puissant du fait de la diminution du gradient de concentration de l'antibiotique.

- Si les bactéries sont sensibles aux antibiotiques, elles ne vont pas se développer dans les zones où ils se trouvent ; cela va créer des zones plus ou moins importantes sans croissance bactérienne autour d'eux.
- Si elles sont résistantes, on n'aura pas de formation des zones d'inhibitions.

La lecture se fait donc par mesure des différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ; et l'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) se fait par comparaison de ceux-ci aux limites critiques conseillées par le **CA-SFM/EUCAST 2019**.

III.6.3. Avantages et inconvénients

La méthode de diffusion en milieu gélosé présente de nombreux avantages :

- Permet de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique.
- Permet la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.
- Caractérisée par la simplicité, reproductibilité, flexibilité, cout faible et pas d'équipement spécialisé, etc.

En revanche, seul un résultat qualitatif en catégorisation clinique est rendu au clinicien tandis que certains antibiotiques, ne peuvent pas être testés par cette méthode (par exemple glycopeptides, daptomycine, polymyxines) (**Denis et al., 2016**).

III.7. Détection des carbapénèmases

Une détection rapide et fiable de la production de carbapénèmases parmi les isolats cliniques est cruciale sur le plan épidémiologique pour surveiller et contrôler leur diffusion. Leur détection doit être systématiquement initiée devant toute bactérie ayant une sensibilité diminuée (I ou R) à au moins l'un des carbapénèmes (tableau X) (**Birgy et al., 2012; Denis et al., 2016**).

La production potentielle de carbapénémase est généralement examinée en premier par des tests de sensibilité conventionnels; cependant, ce dépistage est entravé car la sensibilité aux carbapénèmes peut varier considérablement entre les producteurs de carbapénémases et le niveau de résistance peut parfois être limite au seuil de sensibilité (Aguirre-Quiñonero *et al.*, 2017). Pour cela, la stratégie de détection comprend une étape de présélection, suivie d'une étape de confirmation phénotypique et génotypique (Birgy *et al.*, 2012).

Tableau X : Valeurs critiques de la concentration minimale inhibitrice (mg/L) pour les carbapénèmes selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2019.

| Carbapénème | CMI (concentrations critiques) (mg/L) | | | | | |
|------------------------------|---------------------------------------|-------|--------------------|-----|----------------------|-----|
| | <i>Entérobactéries</i> | | <i>Pseudomonas</i> | | <i>Acinetobacter</i> | |
| | S | R | S | R | S | R |
| Méropénème (10 µg) | ≤ 2 | > 8 | ≤ 2 | > 8 | ≤ 2 | > 8 |
| Imipénème (10 µg) | ≤ 2 | > 4 | ≤ 4 | > 8 | ≤ 2 | > 4 |
| Ertapénème (10 µg) | ≤ 0,5 | > 0,5 | - | - | - | - |

III.7.1. Méthodes phénotypiques

Au cours des dernières années, un nombre croissant d'essais non moléculaires pour la détection rapide de l'activité carbapénémase ont été décrits. Ces tests sont conçus pour fournir des informations préliminaires avant que les tests de confirmation ne soient effectués par des méthodes moléculaires (Aguirre-Quiñonero *et al.*, 2017).

A. Méthodes de culture

A.1. Algorithme de détection du CA-FSM/EUCAST

Algorithme phénotypique de criblage des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) au sein des souches non sensible aux carbapénèmes, recommandé par le CA-FSM/EUCAST depuis 2015 (figure 07) repose sur l'ajout de certains antibiotiques à l'antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton (Sakalli *et al.*, 2019).

Cet algorithme est notamment:

- Basé sur les diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques marqueurs : ticarcilline + acide clavulanique, témocilline et imipénème (ou méropénème).
- Considéré comme étant la meilleure méthode pour la détection des EPC caractérisée par une bonne sensibilité et une spécificité conforme aux recommandations mais nécessitant des tests de confirmation par la suite (Sakalli *et al.*, 2019).

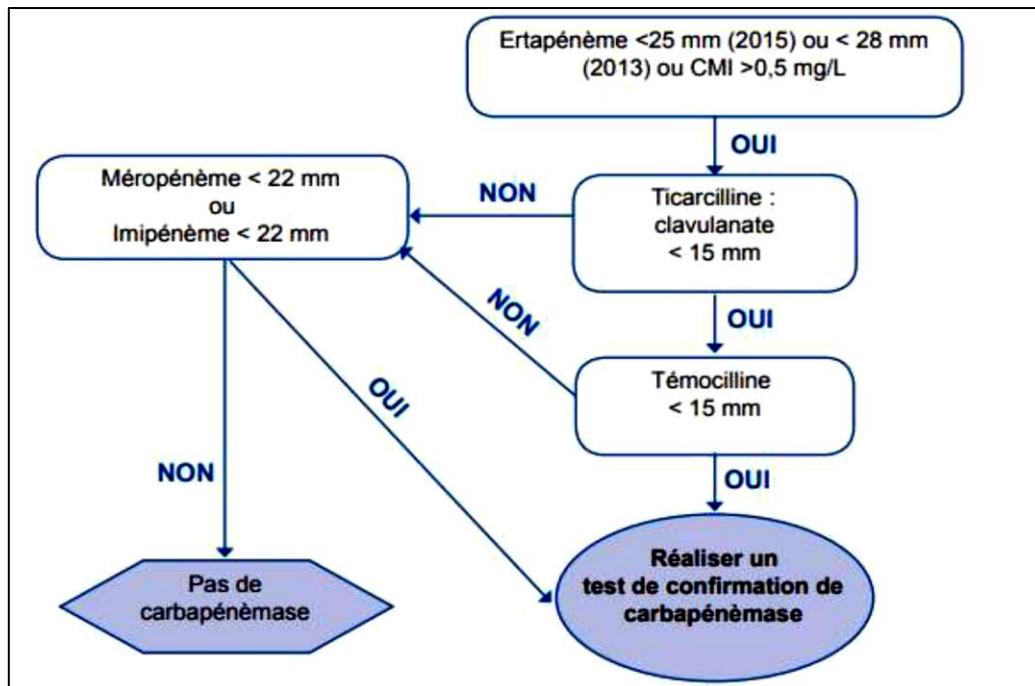


Figure 07 : L'algorithme de criblage proposé par l'EUCAST en 2015(Sakalli *et al.*, 2019).

A.2. Test de Hodge modifié

Le test de Hodge modifié est l'une des techniques phénotypiques classiquement utilisées pour la détection des carbapénèmases. Il permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre souche productrice de carbapénèmases (souche à tester) et souches sauvages de référence sensibles (souche indicatrice) (Poirel *et al.*, 2013).

Ce test consiste en premier lieu à déposer un disque d'imipénème (10 µg) ou d'ertapénème (10 µg) au centre d'une boîte de gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec la souche de référence *E. coli ATCC 25922* sensible à tous les antibiotiques ; ensuite à ensemencer la souche à tester, la souche témoin positif et la souche témoin négatif sur la gélose sous forme de stries en ligne droite depuis le bord du disque jusqu'au bord de la gélose et enfin à incuber la boîte à 35 ± 2 °C pendant 24h .

Après 24 heures, la déformation de la zone d'inhibition en forme de feuille de trèfle indique la production probable d'une carbapénémase (figure 08) (Amjad *et al.*, 2011).

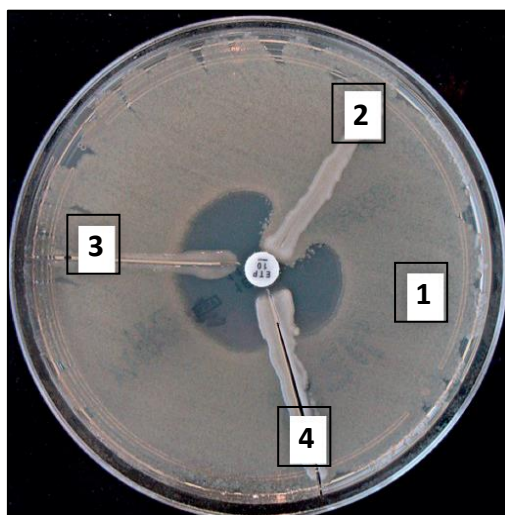


Figure 08 : Principe du test de Hodge modifié. (1) Souche d'*Escherichia coli* sensible à l'ertapénème, (2) Souche positive, (3) et (4) Souches négatives (Poirel *et al.*, 2013).

A.3. Test CIM (Carbapenem Inactivation Method)

Comme le CIM (Méthode d'Inactivation des Carbapénèmes) fournit un outil d'identification facile et rapide des bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes et offre une alternative peu coûteuse pour les autres tests notamment test Carba NP (van der Zwaluw *et al.*, 2015), ce test allait être adopté pour notre étude.

Le principe de ce test est basé sur l'inactivation *in vitro* du méropénème contenu dans un disque chargé à 10µg par les souches productrices de carbapénémases.

Ce test consiste à : immerger un disque de méropénème de sensibilité active (10 µg) dans une suspension composée d'une boucle d'inoculation complète de 10 µL de culture homogénéisée dans 400 µL d'eau ; retirer le disque de la suspension après une incubation d'au moins deux heures à 35 °C et le placer sur une plaque de gélose Mueller-Hinton préalablementensemencée d'une souche indicatrice d'*E. Coli ATCC 25922* sensible ; enfin, incuber la boîte à 35 °C pendant 6 à 24h (figure 09) (van der Zwaluw *et al.*, 2015).

Après incubation, la lecture des résultats est faite comme suit :

- Absence d'une zone d'inhibition signifiée que le méropénème dans le disque de sensibilité a été inactivé durant la première incubation, ce qui a permis une croissance sans inhibition de la souche indicatrice sensible lors de la deuxième incubation et donc l'isolat bactérien produisait de la carbapénémase.
- La présence d'une zone d'inhibition claire désigne que le méropénème n'a pas été dégradé et l'isolat bactérien ne produisait pas de la carbapénémase (van der Zwaluw *et al.*, 2015).

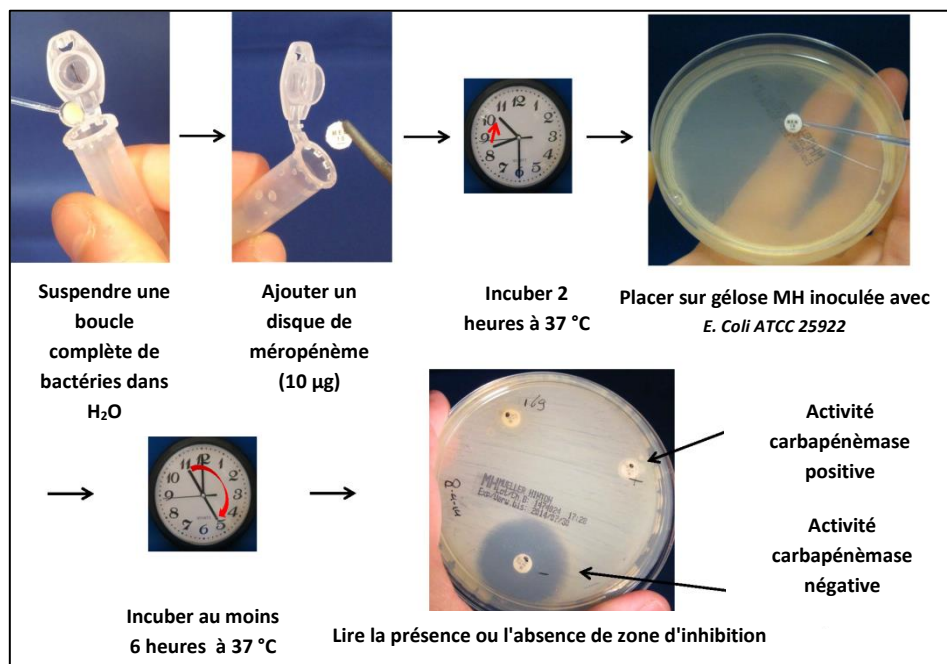


Figure 09 :Schéma du test CIM (van der Zwaluw *et al.*, 2015).

A.4. Tests aux inhibiteurs de β -lactamases

Les tests d'inhibitions utilisent les capacités de certaines molécules à inhiber l'activité enzymatique des β -lactamases et fournissent une méthode de confirmation phénotypique pratique, précise et bon marché pour la production de carbapénèmases de classe A, B et OXA-48 (Van Dijk *et al.*, 2014).

Différents inhibiteurs peuvent être utilisés pour mettre en évidence la présence d'une carbapénémase de classe A type KPC par exemple : acide clavulanique, acide boronique (BA) ou de classe B type NDM, VIM ou IMP par exemple : EDTA, acide dipicolinique (DPA). En revanche, aucun inhibiteur spécifique de la carbapénémase de classe D type OXA-48 n'est reconnu actuellement mais une résistance à la témocilline induit à une forte présomption de son expression (Denis *et al.*, 2016).

L'utilisation simultanée de disques de diffusion imbibés de méropénème seul, témocilline seule, méropénème + BA, méropénème + DPA, Méropénème + DPA + BA, méropénème + cloxacilline (inhibiteur d'AmpC), permet l'identification des différents mécanismes de résistance :

1. Un diamètre d'inhibition supérieur en présence de cloxacilline (qui inhibe AmpC mais pas KPC) indique la présence d'AmpC.

2. Un diamètre d'inhibition supérieur en présence de DPA indique une expression de MBL.
3. Un diamètre supérieur en présence de BA mais pas en présence de cloxacilline indique l'expression de AmpC.
4. Si aucune différence n'est observée en présence des inhibiteurs, et qu'il n'y a pas de zone d'inhibition avec la témocilline, il y a une forte présomption d'expression d'OXA-48 ou apparenté (**Van Dijk et al., 2014**).

B. Tests d'hydrolyse des carbapénèmes

Des techniques reposant sur la détection de l'hydrolyse des carbapénèmes sont également disponibles :

B.1. Tests colorimétriques

Dans la méthode colorimétrique, l'hydrolyse des carbapénèmes entraîne une acidification du milieu responsable du virage de couleur d'un indicateur de pH (par exemple rouge de phénol) (**Denis et al., 2016**).

Le Carba NP est un test biochimique fiable, rapide, peu onéreux, et peut être mis en place dans n'importe quel laboratoire de microbiologie pour la détection des carbapénémases, en particulier des classes Ambler A et B, avec une spécificité supérieure (**Dortet et al., 2013 ; Harabák et al., 2014 ; Bouslah, 2019**).

Développé en 2012 par Patrice Nordmann, Laurent Poirel et Laurent Dortet, le principe de ce test est simple (figure 10), basé sur la détection de l'acidification résultant de l'hydrolyse *in vitro* de l'imipénème par une carbapénémase *via* le changement de couleur d'un indicateur coloré : rouge de phénol (du rouge au jaune-orangé) (**Dortet et al., 2013 ; Ogbolu & Webber, 2014**).

Ce test peut être réalisé directement sur des colonies isolées ou à partir de l'antibiogramme et il peut détecter en moins de 2 h après incubation à 37 °C l'hydrolyse de l'imipénème (**Dortet et al., 2013**).

Comme le but étant de contenir le coût, d'améliorer les performances et de réduire le temps de traitement, le test a été modifié à plusieurs reprises et a évolué d'une procédure fastidieuse à un test rapide avec une manipulation simplifiée permettant le développement d'une version commercialisée, à savoir le RAPIDEC®CARBA NP (bioMérieux), Blue Carba etc. (**Bouslah, 2019**).

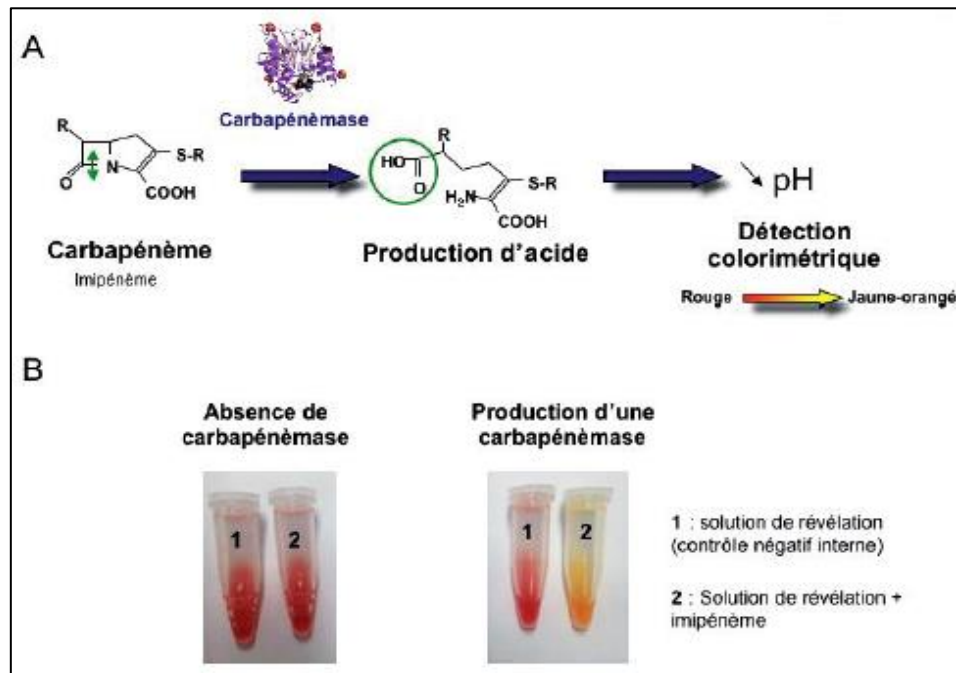


Figure 10 : (A) Principe du Carba NP test, (B) Résultats du Carba NP test (Dortet *et al.*, 2013).

Le β -Carba test est l'un des tests colorimétriques les plus récemment produits, dérivé du test Carba NP. C'est une nouvelle technique biochimique disponible dans le commerce basée sur le changement de couleur d'un substrat chromogène non divulgué en présence d'enzymes hydrolysant les carbapénèmes (Bernabeu *et al.*, 2017 ; Bayraktar *et al.*, 2019).

Ce test réalisable à partir de colonies bactériennes, implique un changement de couleur du jaune au rouge orangé ou violet en présence d'une carbapénémase et qui est visible à l'œil nu en 30 minutes après incubation à 37 °C (Bernabeu *et al.*, 2017).

B.2. Test électrochimique

Le BYG (Bogaerts-Yunus-Glupczynski) Carba test est une nouvelle méthode électrochimique originale de détection rapide de l'activité carbapénémase. Il détecte les variations de conductivité d'une électrode revêtue de polyaniline (un polymère conducteur électro-sensible), très sensible aux variations de pH et de l'activité redox de la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'imipénème (Bogaerts *et al.*, 2016).

Les modifications de la conductivité sont suivies, analysées, rapportées et enregistrées en temps réel par un logiciel. Le potentiostat utilisé est un dispositif « fait-maison » par les personnes l'ayant développé (figure 11) (Bogaerts *et al.*, 2016).

En outre, le BYG Carba test offre plusieurs avantages par rapport aux méthodes colorimétriques du fait que ce test :

1. Réduit le temps d'obtention des résultats à environ 30 min, et peut être effectuée à température ambiante sans incubation à 37 °C.
2. Capte mieux le signal d'hydrolyse des carbapénèmases qu'un seul indicateur colorimétrique de pH.
3. Permet la mesure objective en temps réel et la traçabilité du signal (les résultats étant visualisés sous forme de courbe en temps réel).

Dans le cadre du processus d'accréditation du laboratoire clinique, cet élément peut représenter un avantage substantiel (**Bogaerts et al., 2016**).

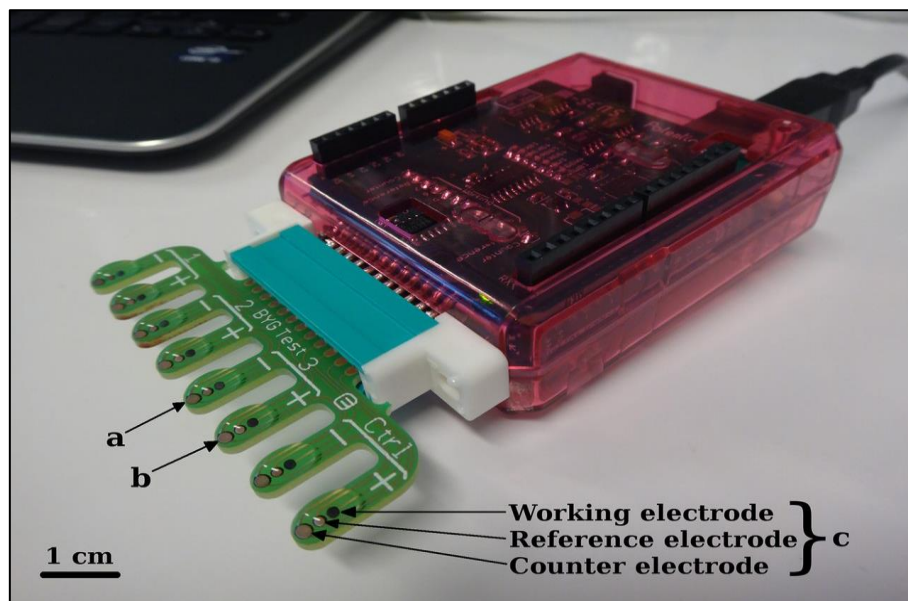


Figure 11 : Potentiostat maison et électrode jetable à huit sondes (**Bogaerts et al., 2016**).

B.3. Spectrométrie de masse : MALDI TOF

La Spectrométrie de masse type MALDI TOF est une technique nécessitant une mise au point fine, du personnel particulièrement entraîné et un spectromètre de masse (**Kempf et al., 2012**).

Son principe est basé sur l'ionisation de la cible (constituée de l'échantillon à analyser et de la matrice), à partir d'une source laser. Les ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et projetés vers un détecteur. Ces ions sont séparés et analysés en fonction de leur temps de vol, dépendant de leur masse (**Kempf et al., 2012**).

Récemment, différentes techniques utilisant la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ont été développées pour la détection d'une activité carbapénémase. Ces techniques consistent en la recherche d'une modification du spectre d'un carbapénème sous l'effet d'une carbapénémase à partir d'une culture bactérienne (Kempf *et al.*, 2012).

Après une incubation des bactéries (de taille d'une boucle de 10 μ L) avec 1 ml de NaCl à 0,45% et de l'imipénème à des concentrations allant de 0,25 mg/ml à 2 mg/ml pendant 4 h, centrifuger le mélange pendant 3 minutes à 12 000 x g et analyser le surnageant par MALDI-TOF MS (Kempf *et al.*, 2012).

Le résultat est considéré comme positif pour la production de carbapénémase si le pic spécifique de l'imipénème (300,0 m/z) disparaissait complètement pendant la durée d'incubation et si le pic du métabolite naturel à 254,0 m/z augmentait tel que mesuré par l'aire sous les courbes conduisant à un rapport entre le pic d'imipénème et son métabolite devenant $< 0,5$ (figure 12) (Kempf *et al.*, 2012).

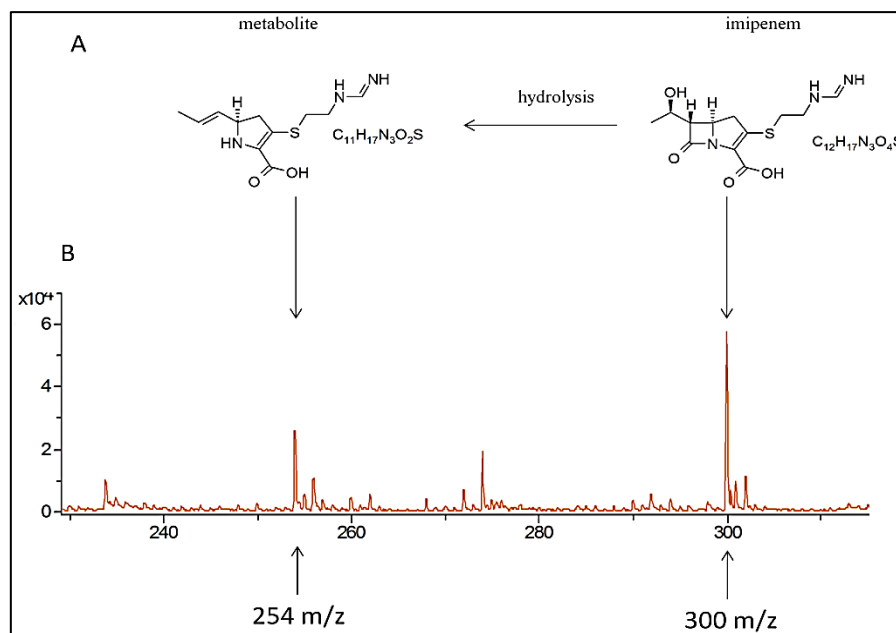


Figure 12 : Analyse MALDI-TOF MS de l'imipénème. (A) Imipénème et son produit de dégradation naturel, (B) Spectres de masse de l'imipénème et de son produit de dégradation naturel tel que déterminé à l'aide du spectromètre de masse (Kempf *et al.*, 2012).

C. Méthodes immunochromatographiques

Des tests immunochromatographiques (TIC) ont été récemment développés pour la détection des bactéries productrices de carbapénémases notamment les EPC à partir de cultures sur des milieux solides (figure 13) (Hamprecht *et al.*, 2018).

Les TIC détectent des épitopes spécifiques d'une carbapénémase, sont très rapides (≤ 15 min) et ont démontré une excellente sensibilité et spécificité à travers différentes variantes et espèces de carbapénémases. Parmi ces tests, on trouve le test RESIST-3 OKN, un nouveau multiplex TIC basé sur des anticorps monoclonaux contre les carbapénémases de type OXA-48-like, KPC et NDM (Hamprecht *et al.*, 2018).

Après culture des bactéries pendant 18 h à 37 °C sur des plaques de gélose Mueller-Hinton II (Oxoid), la détection d'OXA-48, KPC et NDM à l'aide des cassettes Coris Resist-3 OKN est réalisée selon le protocole du fabricant (CORIS BioConcept):

- Emulsionner une seule colonie bactérienne dans 10 gouttes du tampon de lyse.
- Charger les cassettes avec 3 gouttes de lysat.
- Lire les résultats dans les 15 minutes (Hamprecht *et al.*, 2018).

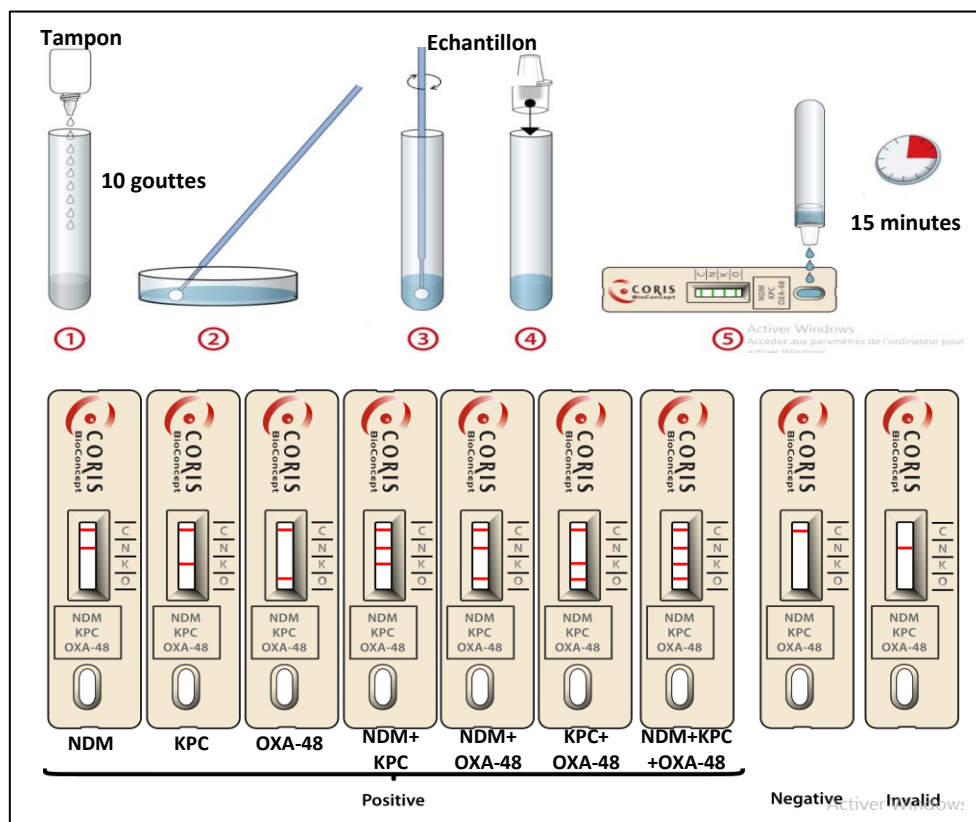


Figure 13 : Test RESIST-3 OKN : procédure et lecture des résultats (Sağiroğlu *et al.*, 2018).

D. Milieux chromogènes de dépistage

Une panoplie de milieux chromogéniques (milieux contenant des molécules chromogènes susceptibles de contribuer à la reconnaissance des espèces) ont été utilisés et sont utilisés encore pour le dépistage de bactéries multirésistantes. Parmi ceux-ci :

Le ChromID ESBL (bioMérieux) est un milieu initialement conçu pour cribler les producteurs de BLSE présentant une bonne sensibilité mais son principal inconvénient est son manque de détection des producteurs de type OXA-48 sensibles au céfpodoxime en l'absence de coproduction d'un BLSE. De plus, ce milieu manque de spécificité, car les producteurs de BLSE largement répandus peuvent être co-sélectionnés sur ce milieu (**Nordmann *et al.*, 2012**).

Le CHROMagar KPC (CHROMAGAR) est un milieu contenant des carbapénèmes, détecte les producteurs de carbapénémase uniquement s'ils sont résistants à des niveaux élevés de carbapénèmes. Par conséquent, son principal inconvénient reste son manque de sensibilité, car il ne détecte pas les producteurs de carbapénémase avec un faible niveau de résistance aux carbapénèmes (**Nordmann *et al.*, 2012**).

Compte tenu de l'importance actuelle de détecter avec précision les producteurs de carbapénémase, un nouveau milieu de criblage hautement sélectif et spécifique appelé « milieu SUPERCARBA » (bioMérieux) a été conçu. Dans ce milieu non seulement les bactéries sensibles aux β -lactamines sont inhibées, mais également la plupart des hyperproducteurs BLSE et AmpC sont inhibés, ce qui le rend l'outil très spécifique pour la sélection des bactéries productrices de carbapénémase dans des selles contenant également une grande quantité de producteurs de BLSE (**Nordmann *et al.*, 2012**).

III.7.2. Méthodes génotypiques

Depuis deux décennies, les techniques moléculaires ont pris une place croissante et désormais prépondérante dans les laboratoires cliniques. Celles-ci sont principalement axées sur la détection des gènes codant pour les carbapénémases (**Decousser *et al.*, 2017**).

Les principales technologies actuellement mises en œuvre en tant que méthodes de routine sont la réaction en chaîne par polymérase (PCR), y compris la PCR en temps réel permettant l'identification bactérienne ainsi que la détection de gènes de résistance, hybridation par PCR, y compris le micro-réseau (biopuces à ADN), pour identifier les séquences moléculaires, et séquençage (en particulier, le séquençage de nouvelle génération)

qui sera probablement considéré comme des techniques de routine d'ici quelques années (Decousser *et al.*, 2017).

Les principaux inconvénients des techniques moléculaires sont leur coût et la nécessité de disposer de microbiologistes formés. Un problème supplémentaire avec ces méthodes est que la gamme de gènes de résistance à détecter est prédéfinie. Ainsi, ces méthodes peuvent ne pas détecter de nouveaux gènes de résistance, engendrant des résultats faussement négatifs (Harabák *et al.*, 2014).



Chapitre IV:

*Portage des bacilles à Gram négatif
résistants aux carbapénèmes*

IV. Portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

La propagation rapide des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes (BGN-RC) constitue l'un des plus grands défis pour la santé mondiale. Ils sont associés à une morbidité et une mortalité accrues et sont capables de coloniser silencieusement le tractus gastro-intestinal.

En effet, cette résistance ne cesse à croître et n'a épargné aucun pays, que ce dernier soit riche ou pauvre (Monnet, 2000; Torres-Gonzalez *et al.*, 2015). De ce fait, l'objectif principal de ce chapitre est l'exposition de la situation épidémiologique du portage et de l'acquisition de BGN-RC dans les établissements de santé.

IV.1. Portage des bacilles à Gram négatif

Après la rupture des membranes amniotiques, le corps humain est exposé à un nombre considérable de microorganismes. Au cours de leur vie, les humains rencontrent un grand nombre d'espèces bactériennes qui ont le potentiel de coloniser, mais peu le font. Parmi celles-ci, beaucoup sont rapidement éliminés dès que les conditions favorables à leur persistance disparaissent (*Pseudomonas* et *Acinetobacter*). Néanmoins, certaines peuvent persister pendant des mois ou des années formant un écosystème complexe (entérobactéries productrices de BLSE) (Labout, 2010).

IV.1.1. Définition du portage bactérien

Le portage est définie par : la présence, la croissance et la multiplication d'un microorganisme sur le corps ou dans l'organisme chez une personne, sans invasion tissulaire, blessure cellulaire ou signe clinique et/ou symptôme de l'infection.

La majorité des patients qui contractent une bactérie multirésistante sont plus colonisées qu'infectées (Santé publique Ontario, 2019).

IV.1.2. Saprophyte ou commensale ?

Le caractère commensal ou saprophyte des BGN-RC est essentiel pour comprendre l'épidémiologie des souches, la dynamique de dissémination et les stratégies de maîtrise (Lucet & Birgand, 2011).

A. Bactéries saprophytes

Acinetobacter baumannii et *Pseudomonas aeruginosa* sont typiquement des bactéries saprophytes. Elles se trouvent dans l'environnement, mais également sur ou dans notre corps de façon transitoire (Lucet & Birgand, 2011).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire environnementale présente dans les sols, les plantes, les habitats aqueux et les environnements humides, et ne fait pas partie de la flore commensale normale du sujet sain. L'acquisition fréquente de ce pathogène dans les structures de soins, est due à sa transmission manuportée entre patients par le biais des soins qui leur sont prodigués et à sa présence dans les sources d'eaux, mais aussi potentiellement dans les solutions aqueuses, les équipements de ventilation mécanique, les nébuliseurs réutilisables, etc. (Azmoun, 2016; Lucet & Birgand, 2011).

Acinetobacter baumannii, en revanche, s'il n'est pas trouvé dans les flores commensales du sujet sain sous les climats tempérés, il l'est sous les climats chauds et humides (Lucet & Birgand, 2011). Ce pathogène environnemental résistant à de nombreux antibiotiques est responsable d'infections communautaires et des épidémies d'infections nosocomiales. Il peut persister longtemps dans l'environnement hospitalier et sa transmission est manuportée (Poirel & Nordmann, 2006).

Le caractère saprophyte de ces deux bactéries amène à plusieurs conséquences. D'abord, les infections à *A. baumannii* et *P. aeruginosa* concernent essentiellement les secteurs accueillant des patients fragilisés qui conjuguent le confinement des patients, l'utilisation des procédures invasives et une pression de sélection antibiotique importante (Lucet & Birgand, 2011).

Une deuxième conséquence concerne l'environnement, qui participe à l'épidémiologie de ces souches. L'environnement sec pour *A. baumannii* et humide pour *P. aeruginosa*, notamment, ceux situés autour de patients lourdement colonisés, jouent un rôle de réservoir potentiel de pour la transmission des bactéries à d'autres patients (Lucet & Birgand, 2011).

B. Bactéries commensales

La famille des entérobactéries réunit des bactéries commensales qui résident principalement au niveau du tube digestif (Azmoun, 2016). Le prototype de la bactérie commensale est *Escherichia coli*, présent en fortes concentrations dans le tube digestif de chacun (10^8 /g de fèces) (Lucet & Birgand, 2011).

En raison du portage prolongé (durée médiane de portage entre six mois et un an) et du caractère commensal des entérobactéries productrices de carbapénémases, la transmission à l'entourage familial et au milieu hospitalier est possible. Il peut s'agir de transmission de souches mais aussi de transmission de plasmides porteurs de gènes de résistance à d'autres entérobactéries (**Lucet & Birgand, 2011**).

Dans la communauté, les souches d'entérobactéries circulent par transmission manuportée oro-fécale liée à des conditions d'hygiène insuffisante, mais probablement aussi à une contamination de l'eau de boisson dans les pays en développement (**Lucet & Birgand, 2011**).

En milieu hospitalier, la dissémination des EPC est essentiellement manuportée et s'effectue par contacts directs (via le personnel, et les agents de soins, patients etc.) ou indirects (matériel médical souillé) (**Lucet & Birgand, 2011; Santé publique Ontario, 2019**).

IV.1.3. Causes induisant le portage

A. L'utilisation des antibiotiques

Le microbiote intestinal constitue un véritable organe métabolique avec quatre grandes fonctions : immunitaire, métabolique, de structure et sur tout de protection contre l'implantation et la colonisation des bactéries étrangères dite de passage (**Denis et al., 2016**).

La composition, la diversité et la richesse de ce microbiote dépend de nombreux facteurs (âge, sexe, style de vie, régime alimentaire, comorbidités), mais la médication est le déterminant le plus important (**Denis et al., 2016**).

La consommation inappropriée et excessive d'antibiotiques induit à des modifications qualitatives et/ou quantitatives du microbiote (**Denis et al., 2016**).

L'impact quantitatif (perte de diversité) dépend de la concentration des antibiotiques au niveau du colon et de leur activité sur l'espèce bactérienne présente (effet bactéricide ou bactériostatique) ne laissant le système digestif colonisé que par les espèces résistantes à ces antibiotiques (**Dethlefsen et al., 2008; Antonopoulos et al., 2009**).

L'impact qualitatif (perte d'effet de barrière) est dû à l'utilisation des antibiotiques ayant une bonne activité sur les anaérobies (bactéries qui exercent l'effet de la barrière intestinale), et donc affectent puissamment la capacité d'empêcher la colonisation par les

bactéries multirésistantes notamment les BGN-RC (Van der Waaij *et al.*, 1971; Bhalla *et al.*, 2003).

B. La transmission bactérienne

Les réservoirs de bactéries résistantes continuent de croître en taille et en nombre, non seulement dans les hôpitaux, mais aussi dans la communauté, l'environnement, la chaîne alimentaire et chez les animaux, y compris les animaux domestiques, le bétail et les animaux sauvages (Mairi *et al.*, 2018).

La transmission des BGN-RC entre : les patients eux-mêmes, patient-personnel, patient-visiteur, environnement-patient, est favorisée par leur réservoir « le système digestif ». Ce dernier participe au portage et à la dissémination rapide et facile de ces bactéries multirésistantes (Ait-Kaci, 2019).

C. La capacité d'adaptation

L'évolution perpétuelle et l'intelligence bactérienne réside dans sa capacité à s'adapter aisément et d'une manière efficace lorsqu'elle est en contact d'un antibiotique (Ait-Kaci, 2019).

Son génie adaptatif lui permet à travers : des plasmides, des transposons et des mutations de développer de nouvelles résistances favorisant un échec thérapeutique (Ait-Kaci, 2019).

IV.1.4. Facteurs de risques du portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

Différents facteurs hospitaliers et extrahospitaliers peuvent être incriminés dans la prévalence du portage des BGN-RC, à savoir :

A. Facteurs hospitaliers

Plusieurs facteurs liés au patient, à l'environnement et aux interventions de santé contribuent tous à la dynamique des BGN-RC à l'hôpital (Torres-Gonzalez *et al.*, 2015).

Ces facteurs englobent l'exposition intensive et constante des bactéries aux antibiotiques; l'exposition antérieure aux carbapénèmes, à la vancomycine, aux macrolides et à la ciprofloxacine ; les antécédents d'infection; le séjour prolongé à l'hôpital ; l'admission en unité de soins intensifs ; le partage d'une chambre avec des porteurs connus de BGN-RC ou un patient infecté ; le transfert inter-service dans le même établissement hospitalier ou d'un autre établissement ; les ressources limitées ; l'incapacité à impliquer des précautions

d'isolement ou un dépistage régulier des personnes à haut risque et l'exposition à des dispositifs invasifs (cathéters veineux, tube endotrachéal etc.) (**Monnet, 2000; Walsh, 2003; Ghaith et al., 2019; Soria-Segarra et al., 2020**).

B. Facteurs extrahospitaliers

Les facteurs extrahospitaliers englobent l'usage abusif et répété des antibiotiques en industrie agro-alimentaire et en médecine vétérinaire ; le voyage récent dans une zone connue à forte prévalence de BGN-RC ; l'utilisation d'antibiotiques en vente libre et l'hygiène inadéquate en climat chaud et humide qui favorise la croissance bactérienne (**Carle, 2009; Ghaith et al., 2019**).

IV.2. Epidémiologie du portage des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes

La prévalence de la résistance aux carbapénèmes croît dans le monde entier dans toutes les espèces de bacilles à Gram négatif cliniquement importantes (**Nordmann, 2010**). Elle varie en fonction du pays, de l'hôpital et de l'unité d'hospitalisation (**Monnet, 2000**).

D'un point de vue épidémiologique, il existe une propagation préférentielle des mécanismes de résistance aux carbapénèmes en fonction des zones géographiques. NDM-1, par exemple, semble être prédominant en Inde et dans le sous-continent indien, alors qu'OXA-48 prédomine dans le pourtour méditerranéen. KPC d'abord décrite aux États-Unis semble devenir endémique en Israël et en Grèce (**Zahar et al., 2018**).

Cette variabilité de mécanismes peut être associée à des relations historiques / culturelles et à des échanges de populations avec d'autres pays à forte prévalence. Le transfert transfrontalier des patients, les voyages, le tourisme médical et les réfugiés pourraient également jouer un rôle important (**Cantón et al., 2012**).

IV.2.1. À l'échelle mondiale

Bien que les données épidémiologiques soient limitées pour certaines régions, le fardeau global des maladies causées par les BGN-RC est similaire dans la plupart des régions (en Asie-Pacifique, sur le continent indien, en Europe et en Amérique) (**Nordmann & Poirel, 2019**).

Selon les données des études de surveillance à grande échelle et des enquêtes hospitalières de moindre envergure, les taux de résistance aux carbapénèmes sont similaires quelle que soit la méthodologie ou l'antibiotique utilisé pour détecter le mécanisme de résistance. Cependant, l'étude américaine de la base de données Premier Healthcare, qui

recueil des données sur les infections nosocomiales et communautaires, a révélé que 44,8% d'*A. baumannii* et 14,2% de *P. aeruginosa* des isolats étaient résistants aux carbapénèmes, contre seulement 1% des entérobactéries ce qui signifie que les taux de résistance aux carbapénèmes semblent être considérablement plus élevés pour les non fermenteurs (fréquemment > 60%) que pour les fermenteurs (fréquemment <10%) (Nordmann & Poirel, 2019).

En Amérique, environ 50% des isolats résistants aux carbapénèmes testés semblent être des producteurs de carbapénémases de type KPC (66,9% par an) et NDM-1 (17,3% par an). Pour l'OXA-48, une augmentation significative sur une période de 5 ans a été décrite.

En Europe, une prévalence élevée de BGN-RC peut être trouvée en Grèce, en Italie, en Turquie et en Israël, tandis qu'une faible prévalence est encore signalée dans les pays nordiques, en Suisse, en Allemagne et en République tchèque (Cantón *et al.*, 2012).

Contrairement à l'Amérique et à l'Europe, le NDM et les autres MBL (IMP, VIM) et de type OXA-48, plutôt que KPC, étaient les carbapénémases prédominantes dans la BGN-RC en Asie du Sud-Est (Nordmann & Poirel, 2019). Les rapports de surveillance en Inde et dans les pays voisins révèlent que les enzymes carbapénémases les plus fréquentes restent la NDM chez les entérobactéries, l'OXA-23 chez *A. baumannii* et la NDM et/ou VIM chez *P. aeruginosa* (Nordmann & Poirel, 2019).

IV.2.2. À l'échelle nationale

La situation relative aux BGN-RC notamment les EPC, si elle est moins préoccupante actuellement en Algérie, est inquiétante au niveau mondial. Le portage des BGN-RC en Algérie est inconnu à cause d'absence d'études faites sur ce sujet, les rares études faites concernent leur prévalence et leur incidence dans les infections.

Selon le rapport publié en 2016 par le réseau algérien sur la résistance aux antimicrobiens, plus d'un *Acinetobacter spp* sur deux est résistant à l'imipénème, *P. aeruginosa* est résistante à l'imipénème dans 16,64% (148/889) et ce qui est inquiétant c'est l'émergence d'EPC retrouvées à un taux de 2,14% (97/4523) (Amhis, 2018).

Les groupes carbapénémases les plus couramment rencontrés comprennent KPC, NDM et l'OXA-48 ; l'OXA-48 étant censé être endémique en Afrique du Nord notamment en Algérie (Touati & Mairi, 2020).

A. Chez les entérobactéries

Depuis le début de 2010, les carbapénèmases de la classe D (OXA-23 et OXA-58) ou de classe B, y compris VIM-19, ont été considérés comme les premières carbapénèmases détectées chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. En effet, la première carbapénèmase décrite dans les entérobactéries était VIM-19 en 2010, par **Robin et al.** chez 5 souches d'entérobactéries (**Robin et al., 2010**).

Par la suite, la détection de KPC chez les entérobactéries pour la première fois en 2010 puis KPC-3 chez *Klebsiella pneumoniae* dans la ville de Sétif à partir de liquide céphalorachidien d'un enfant a été rapportée respectivement par **Vaux et al.** et par **Bakour et al.** (**Vaux et al., 2011; Bakour et al., 2015**).

En 2014, **Sassi et al.** ont décrit le premier cas autochtone des infections causées par NDM-5 produite par *E. coli* isolée à partir d'urine et de sang spécimens de trois patients dans la ville d'Annaba entre Janvier 2012 et Février 2013 (**Sassi et al., 2014**).

L'Oxacillinase de type OXA-48 identifié pour la première fois chez les entérobactéries en 2010 (**Vaux et al., 2011**), semble être endémique en Algérie en raison de sa propagation aux différentes régions nationales. Cette enzyme a été détectée chez une souche d'*E. coli* isolée à partir d'un patient provenant d'une province frontalière avec la Tunisie à Constantine, puis chez *K. pneumoniae* à Alger en 2014 et à Constantine en 2015 (**Aggoune et al., 2014; Cuzon et al., 2015**).

Très récemment, deux études réalisées par l'équipe de **Touati et al.** et **Mairi et al.** sur le portage fécale des EPC ont rapporté que:

1. En raison du traitement oncologique nécessitant fréquemment le recours à la chirurgie et à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, et de l'exposition à des traitements cytotoxiques qui contribuent à l'affaiblissement du système immunitaire et à l'inflammation intestinale favorisant la translocation microbienne, les patients cancéreux sont plus susceptibles d'être infectés et colonisés par les BMR. En effet, en Algérie la prévalence du portage fécal des EPC chez les patients présentant des cancers colorectaux était de 2,4% (**Touati et al., 2020**).
2. La prévalence des entérobactéries productrices d'OXA-48 était de 4,6% (19/414) et 1,6% (7/422) chez les mères et les nouveau-nés, respectivement, de 2 maternités en Algérie. L'hospitalisation antérieure, l'utilisation d'antibiotiques et la transmission croisée par les mains des agents de santé semble être les principaux facteurs de risque

d'acquisition et du portage asymptomatique des isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* produisant OXA-48 chez les couples mère-nouveau-né. En effet, aucune transmission mère-nouveau-né de ces isolats n'a été observée et aucun nouveau-né porteur n'était prématuré, suggérant donc que ce portage n'a aucun rôle direct sur un accouchement prématuré, mais pouvait par contre influencer le poids à la naissance. En outre, la principale constatation rapportée est toutes les mères porteuses de ce clone étaient admises dans la même pièce et avaient accouché par césarienne (Mairi *et al.*, 2019).

B. Chez *Pseudomonas aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, seul la VIM-2 a été identifié par Touati *et al.* à Annaba et par Sefraoui *et al.* à Oran (M. Touati *et al.*, 2013; Sefraoui *et al.*, 2014).

Récemment, Mellouk *et al.* ont décrit la détection de gène *bla* VIM-4 chez des souches clinique de *P. aeruginosa* dans deux villes Algériennes : Annaba et Skikda (Mellouk *et al.*, 2017).

C. Chez *Acinetobacter baumannii*

Chez *A. baumannii*, la carbapénémase de classe B NDM-1, est la première carbapénémase identifiée à partir des patients algériens transférés en France et en Belgique. Plus tard, cette enzyme a été rapportée dans l'ouest d'Algérie, à Sétif et Alger (Mellouk, 2017).

L'oxacillinase, de type OXA-23 a été la première enzyme détectée en Algérie dans *A. baumannii*. Puis, différents groupes de l'oxacillinase (OXA-24/72 et OXA-58) ont été décrits (Mellouk, 2017).

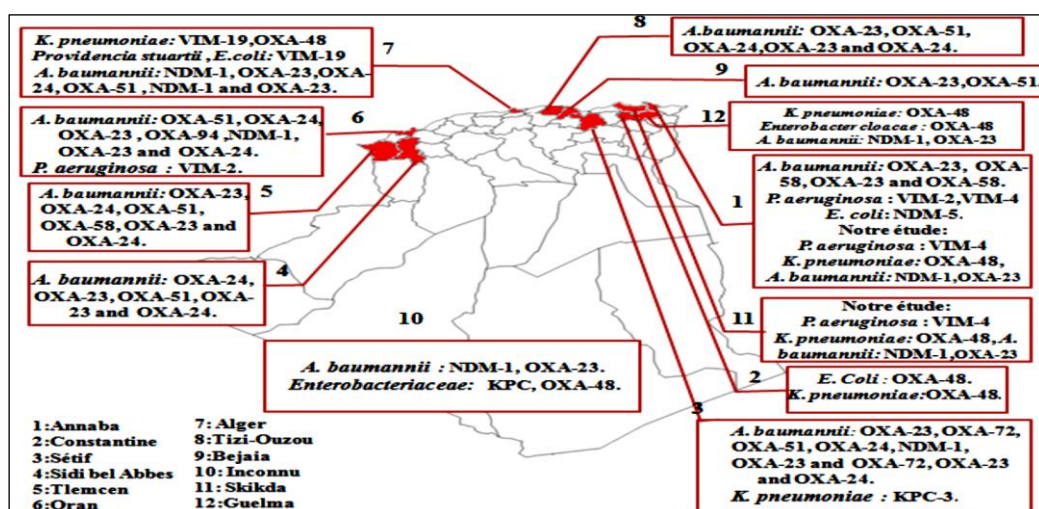


Figure 14 : Carbapénémases décrites dans des isolats cliniques de bacilles à Gram négatif d'Algérie (Mellouk *et al.*, 2017).



Conclusion

Conclusion et perspectives

L'émergence et la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques à pratiquement tout l'arsenal thérapeutique constituent un défi majeur occupant le devant de l'actualité. Ayant d'abord touché l'hôpital, elles ont gagné le milieu communautaire. Les antibiotiques efficaces se raréfient et l'innovation qu'on pensait voir se poursuivre sans fin s'est arrêtée.

Le nombre croissant de sujets immunosupprimés, les interventions chirurgicales nombreuses, l'utilisation accrue de procédures invasives surtout à l'unité de soins intensifs, les failles dans le système de contrôle des infections et l'usage extensif d'antibiotiques en agriculture et pour l'élevage animal sont au nombre des facteurs épidémiologiques responsables du développement et de la propagation de souches résistantes aux antibiotiques.

Comme nous venons de le voir, en raison de l'extension géographique fulgurante des bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes et aussi des alternatives thérapeutiques limitées, ils sont désormais considérés comme une menace importante pour la santé publique classée comme urgente. En effet, on est confronté à une forte prévalence d'infections à BGN-RC surtout en milieu hospitalier et à l'émergence de ces souches par production de carbapénémases fortement épidémiogène; essentiellement au niveau des services à haut risque.

Au terme de ce travail et à la lumière des données disponibles à l'heure actuelle, le constat est que ces souches résistantes sont géo-spécifiques. Cette spécificité serait probablement liée aux habitudes locales telles que l'alimentation, le climat, l'automédication entretenue par la vente illicite des médicaments et peut être associée à des relations historiques/culturelles et à des échanges de populations avec d'autres pays à forte prévalence.

À souligner que, la résistance aux carbapénèmes n'est pas spécifique aux bactéries responsables d'infections nosocomiales. Elle touche également les bactéries des flores commensales (microbiote digestif) qui constituent à la fois un microbiome des individus vivants et un réservoir de bactéries résistantes, servant à la dissémination, faisant parler de « nouveau péril fécal ».

De ce fait, si nous voulons échapper au cauchemar d'un retour à l'ère pré-antibiotique aujourd'hui et pour faire face, à cette menace, deux proverbes prennent place :

« Mieux vaut prévenir que guérir » ;

« La recherche aujourd'hui, c'est réduire l'antibiorésistance demain ».

Toutefois, il serait souhaitable de :

- Compléter la présente étude par une expérimentation pour mettre en relation les connaissances acquises et la réalité du terrain.
- Renforcer de façon durable la mobilisation autour de la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques.
- Initier et lancer une enquête nationale en collaboration avec d'autres disciplines pour :
 - La mise sur pied d'un programme de surveillance efficace de l'usage des antibiotiques.
 - Le contrôle et le dépistage des BGN-RC en cas de portage et non pas comme source d'infection.



Références bibliographiques

A

- Abouelfadl, A. (2019).** Usage des antibiotiques dans l'élevage de volailles et la résistance bactérienne et son impact sur la santé humaine. Thèse de doctorat : pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 131p.
- Agence ontarienne de protection et de promotion de la santé (Santé publique Ontario). (2019).** Foire aux questions - Nouvelle réglementation relative à la déclaration des EPC. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/F/2019/faq-cpe.pdf?la=fr> (Consulté le 20/09/20).
- Aggoune, N., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Benamrouche, N., Naim, M., & Rahal, K. (2014).** Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 327-329.
- Aguirre-Quiñonero, A., Cano, M., Gamal, D., Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2017).** Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 88(3), 214-218.
- Ait-Kaci, O. (2019).** Portage-dépistage des entérobactéries multi-résistantes chez les sujets admis en réanimation, et des sujets atteints d'hémopathies malignes. Thèse de doctorat : pharmacie. Faculté de médecine : Université Saad Dahleb Blida 1, 131p.
- Albichr, I. S., Anantharajah, A., Dodémont, M., Hallin, M., Verroken, A., & Rodriguez-Villalobos, H. (2020).** Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect test for detection and classification of carbapenemases in Gram negatives. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 96(2), 114911.
- Amhis, W. (2018).** Algérie : programme de prévention et de contrôle des infections à bactéries multi-résistantes en milieu de soins, 1, 106-107.
- Amjad, A., Mirza, I. A., Abbasi, S., Farwa, U., Malik, N., & Zia, F. (2011).** Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian journal of microbiology*, 3(4), 189-193.
- Antonopoulos, D. A., Huse, S. M., Morrison, H. G., Schmidt, T. M., Sogin, M. L., & Young, V. B. (2009).** Reproducible community dynamics of the gastrointestinal

microbiota following antibiotic perturbation. *Infection and immunity*, 77(6), 2367-2375.

Avril, J.-L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (2000). Bactériologie clinique. 3^e Edition Ellipses Edition Marketing SA. 602p.

Azmoun, S. (2016). Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au CHU de Marrakech. Thèse Doctorat: Médecine. Marrakech: Université Cadi Ayyad Marrakech. 117p.

B

Bakour, S., Garcia, V., Loucif, L., Brunel, J. M., Gharout-Sait, A., Touati, A., & Rolain, J. M. (2015). Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New microbes and new infections*, 7, 89–93.

Bayraktar, B., Barış, A., Malkoçoğlu, G., Erdemir, D., & Kına, N. (2019). Comparison of Carba NP-direct, carbapenem inactivation method, and β -CARBA tests for detection of carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 97-102.

Bennett, P. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.

Bernabeu, S., Dortet, L., & Naas, T. (2017). Evaluation of the β -CARBATM test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 1646-1658.

Bhalla, A., Pultz, N. J., Ray, A. J., Hoyen, C. K., Eckstein, E. C., & Donskey, C. J. (2003). Antianaerobic antibiotic therapy promotes overgrowth of antibiotic-resistant, Gram-negative bacilli and vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(9), 644-649.

Birgy, A., Bidet, P., Genel, N., Doit, C., Decré, D., Arlet, G., & Bingen, E. (2012). Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1295-1302.

- Bogaerts, P., Yunus, S., Massart, M., Huang, T.-D., & Glupczynski, Y. (2016).** Evaluation of the BYG Carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 349-358.
- Bouslah, Z. (2019).** Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 50(6), 466-479. doi.org/10.1016/j.medmal.2019.12.002.

C

- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., & Rossolini, G. (2012).** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical microbiology and infection*, 18(5), 413-431.
- Carle, S. (2009).** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! *Pharmactuel*, 42, 6-21.
- Cattoir, V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie biologique*, 52(10), 607-616.
- Cerceo, E., Deitelzweig, S. B., Sherman, B. M., & Amin, A. N. (2016).** Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microbial Drug Resistance*, 22(5), 412-431.
- Chaussade, H., Sunder, S., Bernard, L., Coloby, P., Guy, L., Karsenty, G., & Bruyère, F. (2013).** Antibiotic treatments in urology. *Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*, 23(15), 1327-1341.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.
- Courvalin, P. (2008).** Bacterial antibiotic resistance: combinations of biochemical and genetic mechanisms. *Bulletin-Académie vétérinaire de France*, 161(1), 7-12.
- Cuzon, G., Bentchouala, C., Vogel, A., Héry, M., Lezzar, A., Smati, F., & Naas, T. (2015).** First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella*

pneumoniae isolates in Constantine, Algeria. *International journal of antimicrobial agents*, 46(6), 725.

D

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.

Decousser, J.-W., Poirel, L., & Nordmann, P. (2017). Recent advances in biochemical and molecular diagnostics for the rapid detection of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae*: a focus on β -lactam resistance. *Expert review of molecular diagnostics*, 17(4), 327-350.

Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C. (2016). Bactériologie médicale: techniques usuelles, 3rd Edition. France: Elsevier Masson. 600p.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*, 6(11), doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280.

Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2013). Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Feuillets de Biologie*, 312. 1-12.

F

François, J. (2019). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)/ EUCAST. Paris: Societe Francaise de Microbiologie, 144p.

G

Gallagher, J. C., & MacDougall, C. (2016). Antibiotics simplified, 4e Edition. Canada: Jones & Bartlett Learning. 352p.

Gaynor, M., & Mankin, A. S. (2005). Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry-Online*, 2(1), 21-35.

Ghaith, D. M., Mohamed, Z. K., Farahat, M. G., Shahin, W. A., & Mohamed, H. O. (2019). Colonization of intestinal microbiota with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in paediatric intensive care units in Cairo, Egypt. *Arab Journal of Gastroenterology*, 20(1), 19-22.

Gniadek, T. J., Carroll, K. C., & Simner, P. J. (2016). Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. *Journal of clinical microbiology*, 54(7), 1700-1710.

Grall, N., Andremont, A., & Armand-Lefèvre, L. (2011). Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse? *Journal des Anti-infectieux*, 13(2), 87-102.

H

Hamprecht, A., Vehreschild, J. J., Seifert, H., & Saleh, A. (2018). Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One*, 13(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0204157

Hart, T., & Shears, P. (1997). *Atlas de Poche de Microbiologie*, 2^e Edition. France: Flammarion Medecine-Sciences, 314p.

Hologic Aptima. Instructions pour l'utilisation du Aptima™ Multitest Swab Specimen Collection Kit pour les spécimens prélevés par le patient. [En ligne]. Disponible sur : https://www.hologic.com/sites/default/files/packageinsert/Multitest%20How%20to%20Collect%20Instructions%20Patient%20-%20French%20AW-14334-901_003_....pdf (Consulté le 20/09/20).

HPCi : Hygiène, prévention et contrôle de l'infection. BMR - Investigation d'un portage digestif - technique de dépistage. [En ligne]. (Modifié le 06/02/2019). Disponible sur : <https://www.hpci.ch/prevention/fiches-techniques/contenu/vre-investigation-dun-portage-technique-de-d%C3%A9pistage> (Consulté le 20/09/20).

Hrabák, J., Chudáčková, E., & Papagiannitsis, C. (2014). Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical microbiology and infection*, 20(9), 839-853.

K

Kaye, K. S., & Pogue, J. M. (2015). Infections caused by resistant Gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 949-962.

Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C., Berrazeg, M., Brunel, J.-M., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2012). Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*

using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*, 7(2), doi: 10.1371/journal.pone.0031676.

Kon, K., & Rai, M. (2016). Antibiotic Resistance: Mechanisms and new antimicrobial approaches. India: Academic press.436p.

L

Labout, J. (2010). Bacterial carriage in infancy: Risk factors and consequences-The Generation R Study. Thèse de doctorat: rector magnificus. Erasmus Universiteit Rotterdam, 152p.

Lambert, T. (2016). 30.5 *Acinetobacter*. In: Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C., (Eds), Bacteriologie Medicale: Techniques Usuelles, pp. 346-348.

Le Gallou, F., & Lepelletier, D. (2017). Contrôles particuliers et microbiologiques de l'air et contrôles microbiologiques des surfaces dans les établissements de santé. *EMC - Biologie médicale*.12(4), 1-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698\(17\)74812-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698(17)74812-1).

Liassine, N. (2000). Probleme des pathogenes Gram negatif resistants aux antibiotiques en milieu hospitalier [Antibiotic-resistant Gram-negative pathogens in the hospital environment]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 130(50), 1930-1936.

Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in microbiology*, 14(9), 413-420.

Lozniewski, A., & Rabaud, C. (2010). Résistance aux antibiotiques. *CCLIN Sud-Est*. Disponible sur: http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibiotiques_CCLINSE.pdf

Lucet, J.-C., & Birgand, G. (2011). Les bacilles à Gram négatif multi-résistants: où va-t-on? *Journal des Anti-infectieux*, 13(2), 122-132.

M

Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & Touati, A. (2018). OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(4), 587-604.

- Mairi, A., Touati, A., Bessai, S. A., Boutabtoub, Y., Khelifi, F., Sotto, A., . . . Pantel, A. (2019).** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among pregnant women and newborns in Algeria: prevalence, molecular characterization, maternal-neonatal transmission, and risk factors for carriage. *American journal of infection control*, 47(1), 105-108.
- Maugat, S., Berger-Carbonne, A., Colomb-Cotinat, M., Dumartin, C., Coignard, B., Cavalié, P., . . . Gay, E. (2016).** Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable.
- Mellouk, F. Z. (2017).** Evaluation de la résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques « Bactéries isolées dans l'est algérien ». Thèse de Doctorat: Biologie moléculaire et cellulaire, Badji Mokhtar Annaba.240p.
- Mellouk, F. Z., Bakour, S., Meradji, S., Al-Bayssari, C., Bentakouk, M. C., Zouyed, F., & Rolain, J. M. (2017).** First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 335-344.
- Mesaros, N., Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Vanhoof, R., & Tulkens, P. M. (2005).** L'efflux des antibiotiques: un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain médical*, 124(8), 308-320.
- Monnet, D. (2000).** Consommation d'antibiotiques et résistance bactérienne. In: Annales françaises d'anesthésie et de réanimation. Elsevier Masson, pp. 409-417.
- Muylaert, A., & Mainil, J. (2012).** Bacterial antimicrobial resistances: the mechanisms and their contagiousness. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 156(2), 109-123.

N

- Nordmann, P. (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *médecine/sciences*, 26(11), 950-959.
- Nordmann, P., Girlich, D., & Poirel, L. (2012).** Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2761-2766.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement_7), S521-S528.

O

Ogbolu, D., & Webber, M. (2014). High-level and novel mechanisms of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria from tertiary hospitals in Nigeria. *International journal of antimicrobial agents*, 43(5), 412-417.

P

Pérez, C. D.-A., López-Fresneña, N., Carlavilla, A. L. R., Garcia, M. H., Ruiz-Garbajosa, P., Aranaz-Andrés, J. M., & Canton, R. (2019). Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ open*, 9(3), doi: 10.1136/bmjopen-2018-024879.

Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.

Poirel, L., Dortet, L., & Nordmann, P. (2013). Diagnostic des carbapénémases: détection et caractérisation: Carbapénémases. *La Lettre de l'infectiologue*, 28(4), 128-132.

Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical microbiology and infection*, 12(9), 826-836.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D., Bacq-Calberg, C., & Dusart, J. (2003). Microbiologie, 2ème édition française. Bruxelles, Belgique: Éditions De Boeck Université, 1137p.

Q

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440-458.

R

- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009).** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), 4783-4788.
- Robin, F., Aggoune-Khinache, N., Delmas, J., Naim, M., & Bonnet, R. (2010).** Novel VIM metallo- β -lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 466-470.

S

- Sağiroğlu, P., Hasdemir, U., Gelmez, G. A., Aksu, B., Karatuna, O., & Söyletir, G. (2018).** Performance of “RESIST-3 OKN K-SeT” immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *brazilian journal of microbiology*, 49(4), 885-890.
- Sakalli, H. E. B., Touhami, K. O., Katfy, K., Zerouali, K., & Belabbes, H. (2019).** Apport de l'algorithme d'EUCAST dans le criblage des carbapénèmase: Expérience du laboratoire de microbiologie au CHU Ibn Rochd Casablanca. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 25(4), 1290-1296.
- Sassi, A., Loucif, L., Gupta, S. K., Dekhil, M., Chettibi, H., & Rolain, J.-M. (2014).** NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5606-5608.
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020).** Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care*, 8(1), 13.
- Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2014).** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 156-161.
- Soria-Segarra, C., Soria-Segarra, C., Catagua-González, A., & Gutiérrez-Fernández, J. (2020).** Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 80-88.

T

- Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G., & Singh, N. (2017).** Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*, 27, 318-327.
- Tani, Z. B. A.-K., & Arlet, G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169-178.
- Torres-Gonzalez, P., Cervera-Hernandez, M. E., Niembro-Ortega, M. D., Leal-Vega, F., Cruz-Hervert, L. P., García-García, L., & Sifuentes-Osornio, J. (2015).** Factors associated to prevalence and incidence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* fecal carriage: a cohort study in a Mexican tertiary care hospital. *PLoS One*, 10(10), doi: 10.1371/journal.pone.0139883.
- Touati, A., & Mairi, A. (2020).** Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Algeria: A Systematic Review. *Microbial Drug Resistance*, 26(5), 475-482.
- Touati, A., Talbi, M., Mairi, A., MESSIS, A., Adjebli, A., Louardiane, M., & Lavigne, J. P. (2020).** Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacterales Strains in Patients with Colorectal Cancer in the Oncology Unit of Amizour Hospital, Algeria: A Prospective Cohort Study. *Microbial Drug Resistance*.
- Touati, M., Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2426-2427.
- Trémolières, F. (2010).** Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *médecine/sciences*, 26(11), 925-929.

V

- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J., & Lekkerkerk-Van der Wees, J. (1971).** Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *Epidemiology & Infection*, 69(3), 405-411.
- Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015).** The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and

low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One*, 10(3), doi: 10.1371/journal.pone.0123690.

Van Dijk, K., Voets, G., Scharringa, J., Voskuil, S., Fluit, A., Rottier, W., . . . Stuart, J. C. (2014). A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clinical microbiology and infection*, 20(4), 345-349.

Vaux, S., Carbonne, A., Thiolet, J.-M., Jarlier, V., Coignard, B., & RAISIN, C. (2011). Emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2004 to 2011. *Eurosurveillance*, 16(22), 1-7.

W

Walsh, C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance, *American Society for Microbiology (ASM)*. 13(11): 3059–3060. doi: 10.1110/ps.041032204.

Wolff, M., Joly-Guillou, M.-L., & Pajot, O. (2008). Le point sur les carabapénèmes. *Réanimation*, 17(3), 242-250.

Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 736-755.

Y

Yala, D., Merad, A., Mohamedi, D., & Ouar Korich, M. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1), 5-12.

Yves, L. E. L., & Michel, G. (2009). *Staphylococcus aureus*, Morphologies de microbiologie. France: Lavoisier.300p.

Z

Zahar, J.-R., Mootien, J.-Y., & Pilmis, B. (2018). Entérobactéries productrices de carbapénémases en médecine intensive: comment maîtriser le risque? *Médecine Intensive Réanimation*, 27(4), 367-371.

Références bibliographiques

- Zaneveld, J. R., Nemergut, D. R., & Knight, R. (2008).** Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology*, *154*(1), 1-15.
- Ziai, S. (2014).** La résistance bactérienne aux antibiotiques: apparition et stratégies de lutte. Thèse de doctorat: spécialité pharmacie. Université de Limoges. 151p.



Annexes

Annexe I

Questionnaire

| | | |
|---|--|---|
| Hôpital : | Service : | Salle : |
| Date d'admission : .. / .. / | Motif d'admission : | Date de sortie : .. / .. / |
| Nom : | Age : | |
| Prénom : | Sexe : Masculin / ... / Féminin / ... / | |
| Voyage à l'étranger : Oui / / Non / / | | |
| Date : .. / .. / ; Pays : | | |
| Maladies sous-jacentes : | Antécédents chirurgicaux : Oui / / Non / / Date : .. / .. / | |
| Chimiothérapie : Oui / / Non / / | Immunosuppresseur : Oui / / Non / / | Procédure invasive : Oui / / Non / / |
| Hospitalisation dans les mois précédents : Oui / / Non / / Si oui, dans quel service : | | |
| Patient transféré d'un autre service : Oui / / Non / / Si oui, précisez le service : | | |
| Séjour en réanimation : Oui / / Non / / Si oui, combien de jours : | | |
| Patient transféré d'un autre hôpital : Oui / / Non / / | | |
| Antibiothérapie : Oui / / Non / / Antibiotique administré : Date du début : .. / .. / | | |
| Prélèvement à l'admission : Oui / / Non / / Prélèvement à la sortie : Oui / / Non / / Type du prélèvement (s) : | | |
| Résultats : Culture : Positive / ... / Négative / ... / Germe(s) isolé(s) : Antibiogramme : Fait / ... / Non fait / ... / Sensible aux : Résistant aux : | | |

Annexe II

Composition des milieux de culture utilisés (pour 1l d'eau distillée) (Denis *et al.*, 2016)

Bouillon nutritif

- Extrait de viande de bœuf..... **1 g/l**
 - Extrait de levure **2 g/l**
 - Peptone **5 g/l**
 - Chlorure de sodium **5 g/l**
 - pH **7,4±0,2**
-

Gélose de Mueller-Hinton (MH)

- Infusion de viande de boeuf **300 g/l**
 - Hydrolysate de caséine..... **17,5 g/l**
 - Amidon..... **1,5 g/l**
 - Agar..... **17 g/l**
 - pH **7,4±0,2**
-

Gélose Mac Conkey

- Peptone de caséine **17 g/l**
 - Crisal violet **0.001 g/l**
 - Crisal violet **0.001 g/l**
 - Rouge neutre **0.03 g/l**
 - Chlorure de sodium **5 g/l**
 - Mélange de sels biliaires **1.5 g/l**
 - Lactose **10 g/l**
 - Peptone de viande..... **3 g/l**
 - pH **7,4**
-

Annexe III

Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle et de référence en bactériologie. Elle distingue les bactéries à Gram positif et à Gram négatif en fonction de la structure de leur paroi (**Denis *et al.*, 2016**).

Cette coloration est réalisée comme suit:

- Sur frottis fixe à la chaleur puis à l'alcool:
 1. Recouvrir la lame de violet de gentiane : 1 minute;
 2. Rejeter le violet de gentiane ;
 3. Recouvrir de lugol : 1 minute;
 4. Rejeter le lugol ;
 5. Décolorer à l'alcool, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
 6. Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau;
 7. Recouvrir la lame de fuchsine diluée, 30 secondes à 1 minute ;
 8. Laver à l'eau;
 9. Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
 10. Examiner à l'immersion.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (**Denis *et al.*, 2016**).

Tests biochimiques

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturelles, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier (**Denis *et al.*, 2016**).

En revanche, ces caractéristiques ne sont pas suffisamment distinctives ou différentielles, c'est pour ça une connaissance détaillée des activités biochimiques est nécessaire pour avoir l'identité d'une espèce (**Elmanama, 2007**).

Après l'isolement et la purification des bacilles Gram négatif sur milieu Mac Conkey, un certain nombre de tests peuvent être effectués pour déterminer s'il s'agit de l'un des

Enterobacteriaceae, de *Pseudomonas* ou d'*Acinetobacter*. Plusieurs de ces tests sont listés ci-dessous:

❖ Recherche d'une oxydase

Ce test est basé sur la production bactérienne d'une oxydase : la phénylène diamine oxydase. La mise en évidence de cette enzyme à partir d'une culture bactérienne en milieu gélosé est effectuée en présence d'oxygène et de N-diméthyl paraphénylène diamine : un réactif qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme (figure 15) (Denis *et al.*, 2016).

A. Technique

Sur une lame, déposer un disque imprégné par le réactif. Puis, à l'aide d'une pipette pasteur prélever une colonie bactérienne et la déposer sur le disque.

B. Lecture

La lecture se fait après 30 secondes environ :

- Si le disque présente une tache violette : le substrat a été oxydé, la bactérie possède une oxydase.
- S'il reste incolore : il n'y a pas eu de réaction, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

C. Résultats

- *Pseudomonas aeruginosa* est oxydase positive (Elmanama, 2007) .
- Les *Enterobacteriaceae* et *Acinetobacter baumannii* sont oxydase négatives (Elmanama, 2007).



Figure 15 : Réaction d'oxydase. À gauche, réaction d'oxydase positive (par exemple *P. aeruginosa*). À droite réaction négative (par exemple *Escherichia coli*) (Denis *et al.*, 2016).

❖ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (poison cellulaire) en eau et dioxygène (Denis *et al.*, 2016).

En présence d'une bactérie productrice de catalase, une libération d'oxygène gazeux à partir d'H₂O₂ est observée selon la réaction suivante: $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$ (figure 16) (Denis *et al.*, 2016).

A. Technique

Sur une lame, à l'aide d'une pipette pasteur déposer une goutte du peroxyde d'oxygène. Puis, en utilisant une anse de platine exempte d'une action catalasique, prélever une colonie bactérienne et la déposer sur la goutte.

B. Lecture

- Si des bulles d'oxygènes se forment (effervescence), la bactérie possède la catalase.
- Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

C. Résultats

- Les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont catalase positives (Denis *et al.*, 2016).



Figure 16 : Réaction de catalase positive (Denis *et al.*, 2016).

❖ Test uréase

La recherche d'une uréase s'effectue en milieu urée-tryptophane (improprement appelé milieu urée-indole). Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH (Denis *et al.*, 2016).

L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rose-rouge du milieu (figure 17) (Denis *et al.*, 2016).

A. Technique

1. Marquer la surface d'une gélose à l'urée inclinée avec une partie d'une colonie bien isolée ;
2. Incuber la gélose à l'urée oblique à 37 ° C pendant 24 à 48 heures ;
3. Examinez le développement de la couleur rose-rouge.
4. En cas de résultat inconnu, incuber le tube pendant 7 jours pour vérifier si la production d'uréase est lente.

B. Lecture

- Si une coloration rose-rouge apparaît, le test est positif, la bactérie possède une uréase.
- Si n'y a pas de changement de couleur, le test est négatif.

C. Résultats

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les *Enterobacteriaceae* à l'exception de *Proteus* et *Klebsiella*, ne possèdent pas d'uréase (Denis *et al.*, 2016).



Figure 17 : Mise en évidence de la production d'uréase. Exemple de réaction positive pour *Proteus mirabilis* à gauche et négative pour *Escherichia coli* à droite (Denis *et al.*, 2016).

❖ Utilisation du citrate comme source de carbone

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol (Denis *et al.*, 2016).

Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu (**Denis et al., 2016**).

A. Technique

1. Traversez l'inclinaison d'avant en arrière avec un inoculum léger prélevé au centre d'une colonie bien isolée ;
2. Incuber en aérobie entre 35 et 37 ° C pendant 4 à 7 jours ;
3. Observez un changement de couleur du vert au bleu le long de l'inclinaison.

B. Lecture

Une croissance bactérienne avec changement de couleur du milieu du vert au bleu intense signifie que la bactérie utilise le citrate comme source de carbone.

C. Résultats

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les *Enterobacteriaceae* à l'exception d'*E. coli* et *Shigella*, utilisent le citrate comme source de carbone (**Denis et al., 2016**).

❖ Recherche de décarboxylases

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E (**Denis et al., 2016**).

Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide amine étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocresol pourpre (**Denis et al., 2016**).

La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocresol pourpre ; lorsque l'acide amine est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37 °C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive (**Denis et al., 2016**).

Par exemple, *Escherichia coli* possède une lysine décarboxylase alors que *Proteus vulgaris* n'en possède pas (**Denis et al., 2016**).

❖ **Recherche de tryptophane désaminase**

À partir du milieu de Ferguson contenant du tryptophane, du rouge de phénol et de l'urée, il est possible de mettre en évidence une activité tryptophane désaminase (TDA) (Denis *et al.*, 2016).

Une suspension bactérienne dense dans un milieu de Ferguson permet, après incubation à 37°C pendant 18 heures et ajout d'une goutte de perchlorure de fer à 30 %, de mettre en évidence une coloration brune si la bactérie testée est dite TDA⁺ (Denis *et al.*, 2016).

❖ **Test VP**

En pratique, la réaction de Voges Proskauer (VP) est fréquemment réalisée sur les galeries miniaturisées. Sinon, le bouillon Clark-Lubs est ensemencé et incubé 18 heures à 37°C (Denis *et al.*, 2016).

À 1 ml de culture, ajouter 0,5 ml d'alpha naphthol à 6 % et 0,5 ml de soude à 16 %. La lecture est à effectuer dans les 10 minutes (Denis *et al.*, 2016).

Les entérobactéries des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* produisent de l'acétoïne, et donc le test VP est positif (Denis *et al.*, 2016).

❖ **Recherche d'une nitrate réductase**

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO₃⁻) en nitrites (NO₂⁻) et éventuellement en azote (N₂) (figure 18) (Denis *et al.*, 2016).

Un bouillon nitrate (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C (figure 18 A) (Denis *et al.*, 2016).

Après incubation, 3 gouttes du réactif Griess A et 3 gouttes du réactif Griess B sont ajoutées au bouillon (Denis *et al.*, 2016) :

- Si une coloration rose fugace apparaît (figure 18 B), les nitrates ont été réduits au stade nitrites.
- En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase.

L'addition de poudre de Zinc (réactif qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher (Denis *et al.*, 2016):

- Si une coloration rose apparaît (figure 18 C), alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase.
- Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote (figure 18 D).

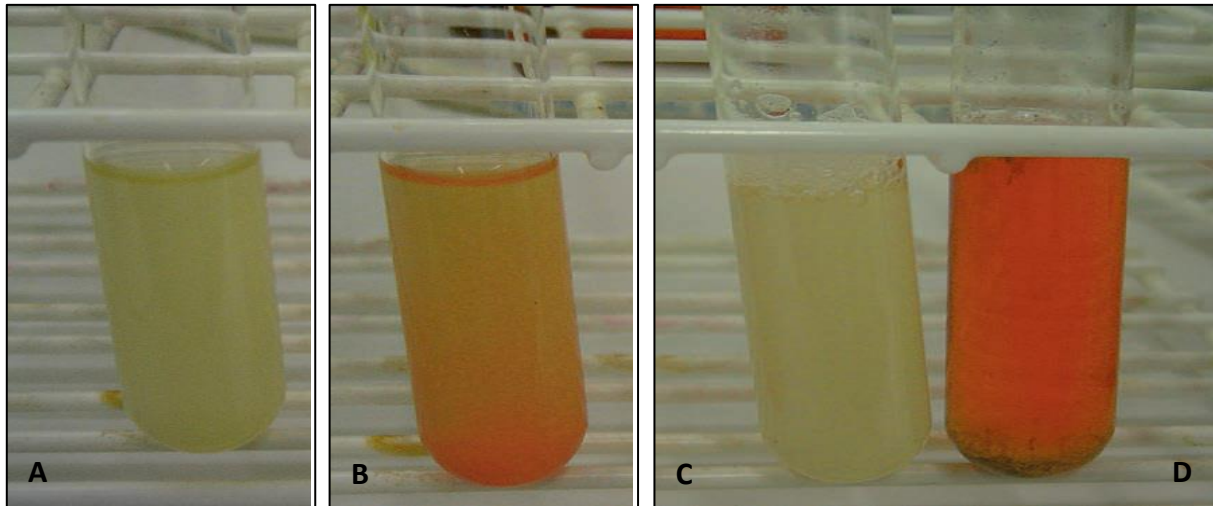


Figure 18 : Recherche d'une nitrate réductase. (A) Bouillon nitraté après culture avant ajout des réactifs ; (B) Après ajout des réactifs Griess A et Griess B, apparition d'une coloration rose: présence de nitrate réductase (*Escherichia coli*) ; (C) Après ajout de poudre de zinc, absence de coloration: présence d'une nitrate réductase (*Pseudomonas aeruginosa*) et (D) Après ajout de poudre de zinc, apparition d'une coloration rose : absence de nitrate réductase (*Acinetobacter baumannii*) (Denis *et al.*, 2016).

Galeries biochimiques

Les galeries de tests biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ADH, GEL etc.) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment (figure 19 A).

La suspension bactérienne à analyser, souvent obtenue suite à une purification des colonies bactériennes sur milieux sélectifs, est versée dans chacun des tubules de la galerie.

Pour les substrats dont le nom est encadré (comme le CIT.), il convient de remplir la cupule. L'objectif est de réaliser des tests en aérobiose (riche en oxygène).

Pour les substrats dont le nom est souligné (ADH, etc.), il convient de remplir la cupule avec de l'huile de paraffine. Cette huile empêche le contact avec l'oxygène, créant ainsi un milieu anaérobie (absence d'oxygène) et empêche également les composés volatils synthétisés lors de la réaction de s'échapper du tube.

Après une période d'incubation de 18 à 24h à température adaptée, la lecture des résultats peut se faire. Il convient de regarder si la réaction est positive ou négative séparément pour chacun des tests. La révélation est permise par la présence d'indicateurs colorés dans les substrats. Un changement de couleur du milieu dans le tube, signifie généralement que le test est positif. Un tableau des caractères à vérifier pour chaque milieu est fourni par le fabricant afin de permettre l'interprétation des résultats (figure 19 B).

Concernant l'interprétation des résultats, les tests sont regroupés par triplet de gauche à droite. Un test négatif vaut toujours 0. La valeur des tests positifs, quant à elle, est différente selon la position du test dans le triplet. Dans chacun d'eux, si le premier test est positif, il vaut 1, si c'est le deuxième, 2, et si c'est le troisième, 4. Il faut ensuite additionner les trois valeurs obtenues pour obtenir le code du triplet (seules huit valeurs, de 0 à 7, sont possibles).

Un code à sept chiffres est obtenu par lecture des codes des triplets de gauche à droite. Ce code, comparé à ceux référencés dans la base de données gérée par le fabricant, permet l'identification de la bactérie (figure 19 C).

L'identification des souches d'*Enterobacteriaceae* est faite par une galerie API 20E, tandis que celle de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* est faite par une galerie API 20NE.

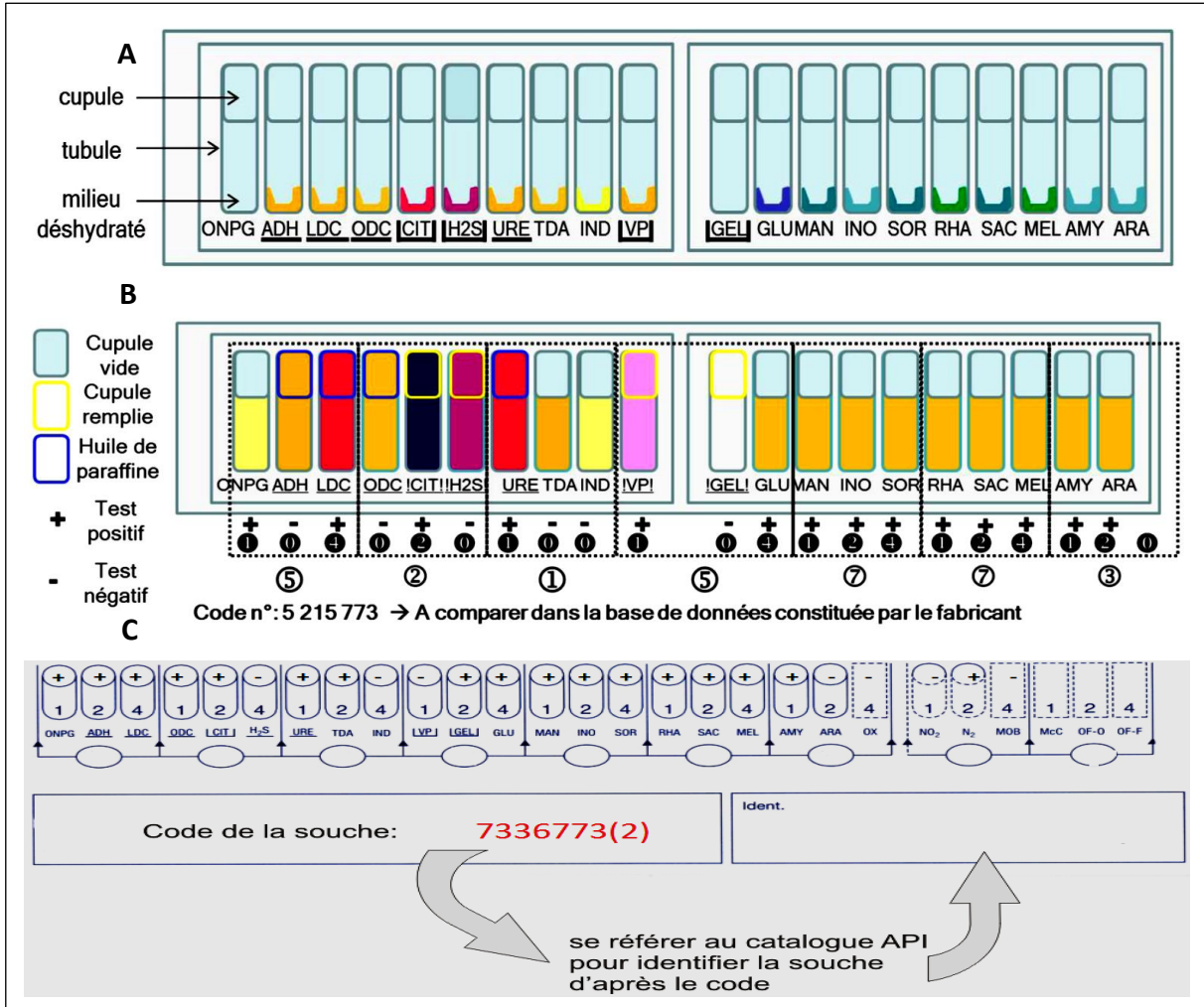


Figure 19 : Galerie API 20E. (A) Les différents composants de la galerie API 20E avant l'inoculation ;(B) Révélation des tests après 24h d'incubation et (C) Interprétation des résultats.

Annexe IV

La liste des antibiotiques (β -lactamines) à tester selon EUCAST/CA-SFM 2019

| Antibiotiques | Abréviations | Charges (μg) | Familles | |
|----------------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Amoxicilline+ Acide clavulanique | AMC | 20-10 | Pénicillines | β-lactamines |
| Céfotaxime | CTX | 5 | Céphalosporines | |
| Céftazidime | CAZ | 10 | 3^{ème} génération | |
| Céfoxitine | FOX | 30 | Céphalosporines | |
| | | | 2^{ème} génération | |
| Céfepime | FEP | 30 | Céphalosporines | |
| | | | 4^{ème} génération | |
| Aztréonam | ATM | 30 | Monobactames | |
| Imipénème | IMP | 10 | Carbapénèmes | |
| Ertapénème | ERT | 10 | | |
| Méropénème | MEM | 10 | | |

Résumé

L'émergence de la résistance aux antibiotiques est un défi mondial menaçant notre capacité à traiter des infections bactériennes, et place alors les soignants dans une situation d'impasse thérapeutique. Parallèlement à l'utilisation massive des carbapénèmes, l'émergence et la propagation des bacilles à Gram négatif (BGN) résistants aux carbapénèmes sont devenue l'une, sinon la première préoccupation qui fait l'objet de nombreuses études actuelles. Les carbapénémases, principaux mécanismes de résistance acquise chez les BGN, ont évolué vers la diversification, l'élargissement de leur spectre d'activité, et leur diffusion parmi de nombreuses espèces. Leur prévalence était plus élevée chez les bacilles non fermentant (*P. aeruginosa* et *A. baumannii*) que chez les *Enterobacteriaceae*, et il y avait des variations significatives entre les pays, les hôpitaux et les services. À la lumière du présent travail mené en vue d'évaluer la prévalence du portage de BGN résistants aux carbapénèmes en milieu hospitalier, nous concluons que le microbiote intestinal et l'environnement hospitalier inanimé constituent un réservoir potentiel de BGN résistants aux carbapénèmes, et que la situation épidémiologique de cette résistance en Algérie est en pleine évolution, comme partout ailleurs à travers le monde. De ce fait, il est nécessaire de connaître la prévalence de la résistance microbienne dans notre zone géographique et leurs caractéristiques épidémiologiques afin d'établir l'ampleur du problème et d'analyser son évolution.

Mots clés : Résistance, carbapénèmes, bacilles à Gram négatif, carbapénémases, portage.

Abstract

The emergence of antibiotic resistance is a global challenge threatening our ability to treat bacterial infections, and puts caregivers in a therapeutic impasse. Along with the massive use of carbapenems, the emergence and spread of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (BGNs) has become one, if not the primary concern that is the subject of many current studies. Carbapenemases, the main resistance mechanisms acquired in BGNs, have evolved towards diversification, broadening their spectrum of activity, and their spread among many species. Their prevalence was higher in non fermenting bacilli (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) than in *Enterobacteriaceae*. In light of this work to assess the prevalence of carrying carbapenem-resistant BGN in hospital settings, we conclude that the intestinal microbiota and the inanimate hospital environment constitute a potential reservoir of BGN resistant to carbapenems, and that the epidemiological situation of this resistance in Algeria is evolved, like everywhere else in the world. Therefore, it is necessary to know the prevalence of microbial resistance in our geographical area and their epidemiological characteristics in order to establish the extent of the problem and to analyze its evolution.

Key words: Resistance, carbapenems, Gram negative bacilli, carbapenemases, carriage.

ملخص

تعتبر مقاومة المضادات الحيوية تحديًا عالميًا يهدد قدرتنا على علاج الالتهابات البكتيرية، و يضع مقدمي الرعاية في مأزق علاجي. إلى جانب الاستخدام المكثف للكاربابينيمات، أصبح ظهور وانتشار سلالات مقاومة للكاربابينيم بين العصيات سالبة الجرام موضوع العديد من الدراسات الحالية. يعرف انزيم الكاربابينيماز، احد الآليات الرئيسية للمقاومة المكتسبة في BGNs، تطوراً وتنوعاً يصاحبه توسع نطاق نشاطه وانتشاره بين العديد من الأنواع. إن انتشاره أعلى في العصيات غير المخمرة (*P. aeruginosa* و *A. baumannii*) عنه في *Enterobacteriaceae*. في ضوء العمل الحالي الذي تم إجراؤه لتقييم انتشار نقل BGNs المقاومة للكاربابينيم في المستشفيات، نستنتج أن الجراثيم المعوية وبيئة المستشفى غير الحية تشكل خزاناً محتملاً لـ BGNs المقاومة للكاربابينيم، وأن الوضع الوبائي لهذه المقاومة في الجزائر يتطور، كما هو الحال في أي مكان آخر حول العالم. لذا، فمن الضروري معرفة مدى انتشار المقاومة في منطقتنا الجغرافية وخصائصها الوبائية من أجل تحديد مدى المشكلة وتحليل تطورها.

الكلمات المفتاحية: المقاومة، الكاربابينيمات، العصيات سالبة الجرام، الكاربابينيماز، الحمل.