

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 MASTER**

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

**Présenté par :**

*ABBAS Chafiaa & BOUAZZA Adidi*

*Thème*

***Résistance aux antibiotiques chez les bacilles  
à Gram négatif***

**Soutenu le :** 28 / 09 / 2020

**Devant le jury composé de :**

<i>Mme. DJENADI Katia</i>	<i>MAB.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. YOUSFI Massilia</i>	<i>MAB.</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 Béjaia</i>	<i>Co-promotrice</i>

*Année Universitaire : 2019/2020*

## *Remerciements*

*Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous a créés, protégé, aidé, et celui qui nous a donné la force, la patience, la volonté et le courage pour pouvoir accomplir notre travail dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci ».*

*Nous adressons notre profonde gratitude et nos vifs remerciements les plus sincères et les plus chaleureux à notre promotrice Mme SAIT-DIB Sabrina d'avoir fait le grand honneur d'accepté de nous encadré et nous dirigé dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Merci pour votre amabilité, gentillesse, dynamisme, soutien, patience, merci pour votre aide précieuse et disponibilité ainsi votre rigueur scientifique au quotidien durant ces années. Merci de nous avoir fait confiance et de nous encouragé pour la réalisation de ce mémoire.*

*Nous voudrions exprimer également nos remerciements les plus sincères à Mme GHAROUT SAIT Alima pour sa gentillesse, son soutien et son aide précieux.*

*Nous remercions aussi cordialement les membres du jury, Mme DJENADI Katia d'avoir honoré ce travail en acceptant de présider le jury et Mme YOUSFI Massilia pour avoir accepté l'invitation comme examinatrice de ce travail. Merci d'avoir consacré leur temps pour la lecture du manuscrit et d'accepté de donner de leur temps pour examiner et juger ce travail.*

*Nous aimerons souligner notre profonde reconnaissance à Dr. BENLALA la directrice de la formation et de la documentation de CHU de Tizi-Ouzou ainsi Dr. L. CHERIFI médecin assistante en microbiologie dans laboratoire de microbiologie de CHU de Tizi-Ouzou de nous accueillir et de nous donner l'accord pour effectuer notre stage de fin d'étude. Merci pour leur gentillesse ainsi de rendre les choses assez facile, et par malheur nous n'avons pas pu d'effectuer le stage pratique à cause de Covide-19.*

*Nous tenons à communiquer nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin d'une quelconque manière à la réalisation de ce mémoire, de ce défi personnel. Merci à tous pour leurs aides et leurs encouragements.*



# Dédicaces

*Je dédie se modeste travaille à :*

*Mes très chers parents, en témoignage de mon affection et mon admiration, pour leur courage, patience, soutien et amour, en hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant. Merci pour votre support moral et affectif. Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer vers l'avant. Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie.*

*Mes chères frères Chafik et Rafik. Ma précieuse sœur Samah, pour sa générosité, affection, soutien moral et financier. Merci, je vous souhaite tellement de succès et de réussites, bonne chance dans votre vie, que la vie vous sourira.*

*Ma chère et adorable enseignante Mme SAIT-DIB Sabrina. Que cette dédicace soit l'expression de mon affection et ma reconnaissance de l'aide précieuse que vous m'avez apporté. Je voudrais désormais vous remercier profondément et chaleureusement pour votre rigueur, gentillesse et bonne humeur, merci pour votre disponibilité, sympathie, votre écoute et oreille attentive, votre ouverture d'esprit et sens critique, votre compréhension ainsi tes précieux conseils, votre sincérité et amitié. Aucun mot ne saurait exprimer ma considération et l'amour que j'éprouve envers vous, votre grand cœur et conscience du devoir me serviront d'exemple toute ma vie. Veuillez trouver ici le signe de mon profond respect.*

*Mme BARDOUS, la directrice de la résidence universitaire Hassnaoua 2 (Bastos) à Tizi-Ouzou, qui m'accueilli chaleureusement dans son bureau, je désire vous remercier profondément pour votre gentillesse, votre écoute et votre aide précieuse ainsi l'encouragement que vous m'avez donné.*

*Mes chères amies AISSAOUI Sonia et YAHYAOUI Amina, pour leur aide, amitié, la bonne humeur, l'esprit créatif et leur sens de l'écoute, pour leur exprimer mes plus profonds sentiments d'amour. Merci pour votre fidélité, je vous souhaite un avenir souriant. Je salue également toutes les qualités humaines si rares de nos jours.*

*L'ensemble de ma famille maternelle et paternelle, merci pour l'encouragement.*

**Chafiaa**





# *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie le Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*Je dédie ce modeste travail...*

*Aux personnes les plus chères dans le monde, mes chers parents.*

*A ma très chère mère*

*Affable, honorable, aimable qui représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas de m'encourager et de prier pour moi.*

*A mon père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices qui ont consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A mes très chères sœurs et mes frères*

*Farida, Fatima, Hakima, Ali, Hamza, Mouhamed et Abdellah.  
Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite.  
J'exprime ainsi mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A ma promotrice Mme Sait-Dib Sabrina*

*La plus adorable et la plus gentille ainsi que sa famille.*

*A ma copine Chafiaa.*

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour elle.*

*A mes amies*

*Dalila, Karima, Souad, Saliha, Samira et Nadia.  
Et à toute mes amies de promotion Microbiologie Appliquée.*

*Adidi*



# Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	01
<b>Chapitre I : Les antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne</b>	
I.1. Les antibiotiques .....	03
I.1.1. Définition .....	03
I.1.2. Classification et mode d'action des antibiotiques .....	04
I.2. Types de résistances aux antibiotiques .....	09
I.2.1. Résistance naturelles .....	09
I.2.2. Résistance acquise .....	10
I.3. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques .....	10
I.3.1. Mécanismes enzymatiques .....	10
I.3.1.1. Résistance chromosomique .....	10
I.3.1.2. Résistance extra-chromosomique (plasmidique) .....	10
I.3.2. Mécanismes non enzymatiques .....	11
I.3.2.1. Modification de la cible (PLP) .....	11
I.3.2.2. Diminution de la perméabilité de la membrane externe .....	11
I.3.2.3. Excrétion active de l'ATB par le système d'efflux .....	12
I.3.2.4. Production de $\beta$ -lactamases .....	12
<b>Chapitre II : Les <math>\beta</math>-lactamases</b>	
II.1. Définition .....	14
II.2. Mode d'action .....	14
II.3. Classification .....	15
II.3.1. Classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros .....	15
II.3.2. Classification moléculaire d'Ambler .....	15
II.4. Evolution des $\beta$ -lactamases .....	17
II.4.1. Les anciennes $\beta$ -lactamases .....	17
II.4.1.1. Les pénicillinases .....	17
II.4.1.2. Les $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV et OXA .....	17
II.4.1.3. $\beta$ -lactamases a spectre étendu (BLSE) .....	17
II.4.2. Les nouvelles $\beta$ -lactamases .....	19

II.4.2.1. BLSE de type CTX-M .....	19
II.4.2.2. BLSE de type PER .....	19
II.4.2.3. BLSE de type VEB .....	19
II.4.2.4. BLSE de type OXA.....	20
II.4.2.5. Autres types de BLSE .....	20
II.4.3. Les céphalosporinases.....	20
II.4.3.1. Les céphalosporinases chromosomiques.....	21
II.4.3.2. Les céphalosporinases plasmidiques.....	21
II.4.4. Les carbapénèmases.....	22

### **Chapitre III : Les bacilles à Gram négatif**

III. Les bacilles à Gram négatif.....	24
III.1. Les entérobactéries .....	24
III.2. Les bacilles a Gram négatif non fermentaires .....	28

### **Chapitre IV : Méthodes de détection des $\beta$ -lactamases**

IV.1. Présentation de l'étude .....	32
IV.2. Méthodes de détection des $\beta$ -lactamases .....	32
IV.2.1. Techniques microbiologiques (phénotypiques).....	33
IV.2.1.1. Test de synergie (DD-test).....	33
IV.2.1.2. Test de synergie sur gélose MH additionée de la cloxacilline .....	34
IV.2.1.3. Test de double disque ou disque combiné .....	35
IV.2.1.4. Les bandelettes E-test .....	35
IV.2.1.5. Test tridimensionnel.....	36
IV.2.1.6. Cica-Beta-Test .....	37
IV.2.1.7. Les disques BBL Sensi-Disk (BD Biosciences, Sparks, MD.) .....	37
IV.2.1.8. Méthodes automatisées.....	37
IV.2.1.9. Méthode de détection des carbapénèmases .....	38
IV.2.1.9.1. Test de Hodge modifié.....	38
IV.2.1.9.2. Test d'inhibition.....	39
IV.2.1.9.3. Les bandelettes E-test MBL.....	40
IV.2.1.9.4. Milieux chromogènes.....	40
IV.2.1.9.5. Test RAPEDIC® CARBA NP ou Carba NP .....	41
IV.2.1.9.6. Technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	42
IV.2.1.9.7. Test Blue Carba®.....	43

IV.2. Techniques moléculaires (génotypiques) .....	43
IV.2.1. Sondes d'ADN.....	44
IV.2.2. Oligotyping .....	44
IV.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	44
IV.2.4. PCR-SSCP .....	45
IV.2.5. PCR-RFLP .....	45
IV.2.6. PCR en temps réel .....	46
IV.2.7. Ligase Chain Reaction (LCR) .....	47
IV.2.8. Séquençage .....	47
IV.2.9. Mini-séquençage.....	48
IV.2.10. Iso-électrofocalisation .....	48
IV.2.11. Détection des carbapénèmases par méthodes moléculaires.....	48
IV.2.12. Détection des carbapénèmases avec des tests immuno-chromatographiques ..	49
IV.3. Epidémiologie du portage des bacilles a Gram négatif résistants au $\beta$ -lactamines .....	50
Conclusion.....	53

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne .....	04
<b>Tableau II :</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique .....	05
<b>Tableau III :</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques .....	07
<b>Tableau IV :</b> Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique .....	08
<b>Tableau V :</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique (folates) .....	09
<b>Tableau VI :</b> Les caractères d'identification biochimiques des genres d'entérobactéries les plus fréquemment rencontrés .....	25
<b>Tableau VII :</b> Résistances naturelles des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	27
<b>Tableau VIII :</b> Résistances acquise des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines .....	28

## *Liste des figures*

<b>Figure 01:</b> Résumé des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	13
<b>Figure 02 :</b> Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame .....	14
<b>Figure 03 :</b> Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie .....	34
<b>Figure 04 :</b> zones d'inhibitions en bouchon de champagne formant une synergie entre le disque d'AMC (acide clavulanique) et ATM (aztréonam) ; CAZ (ceftazidime) ; CRO (ceftriaxone) .....	34
<b>Figure 05 :</b> Schéma de détection des BLSE par le test de double disque .....	35
<b>Figure 06 :</b> Bandelettes Etest® BLSE.....	36
<b>Figure 07 :</b> Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénèmases .....	39
<b>Figure 08 :</b> E-test MBL (Imipenem vs Imipenem/EDTA).....	40
<b>Figure 09 :</b> Carba NP test, l'indicateur du pH vire du rouge au jaune/orange lors de la présence d'une carbapénèmase .....	41
<b>Figure 10 :</b> Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF .....	42
<b>Figure 11:</b> Résultats d'un test blue Carba (A, B, C : Résultats positifs, D : résultat négatif). 43	
<b>Figure 12 :</b> Principe d'un test immunochromatographique.....	49
<b>Figure 13 :</b> Répartition géographique de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Algérie.....	50

## *Liste des abréviations*

**ABC** : ATP-Binding Cassette

**ACC**: Ambler class C

**ACT**: AmpC type

**ADH** : Arginine Déshydrogénase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AMC** : Amoxicilline-Acide Clavulanique

**AMIB** : Aminopénicillines-Inhibiteur de Béta-lactamase

**AmpC** : Chromosomal located céphalosporinase

**ARI** : Acinetobacter resistant to imipenem

**BEL** : Belgium extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

**BES** : Brazilian extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

**C1G** : Céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération

**C2G** : Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

**C4G** : Céphalosporine de 4<sup>ème</sup> génération

**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CFE** : *Citrobacter freundii*

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CMY** : Active on cephamycins

**CTX-M** : Cefotaximase, first isolated at Munich

**DHA**: Dhahran

**EARSS** : European Antimicrobial Resistance Surveillance System

**ECA** : Enterobacterial Common Antigen

**EDTA** : Ethylene diamine tetra acetic Acid

**EPC** : Entérobactéries Productrices des Carbapénèmases

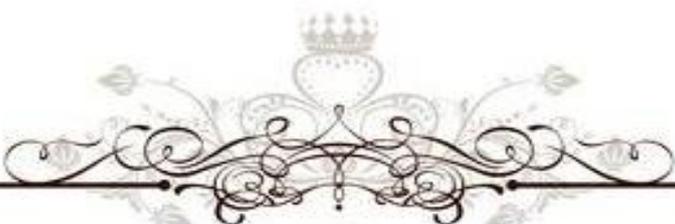
**EUCAST** : European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**FOX** : Active on cefoxitin

**FQ** : Fluoroquinolones

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

**GIM** : German **imipenemase**  
**HPA** : Health Protection Agency  
**IBL** : Inhibiteur de  $\beta$ -lactamase  
**IMI** : Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase  
**IMP** : Imipenemase  
**KPC** : *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmases  
**LAT** : Active on Latamoxef  
**LDC** : Lysine Décarboxylase  
**LPS** : Lipopolysaccharides  
**MATE** : Multidrug an Toxic-compound Extrusion  
**MBL** : Metallo- $\beta$ -Lactamases  
**MFS** : Maior Facilitator Superfamily  
**MIR** : Miriam Hospital  
**MOX** : Active on moxalactam  
**NDM** : New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamases  
**NMC** : Non Metallo-Carbapénèmases  
**ODC** : Ornithine Décarboxylase  
**OXA** : Oxacillinase  
**PER** : Pseudomonas extended resistant  
**PLP** : Protéines liant les pénicillines  
**RND** : Resistance Nodulation cell Division  
**SFO** : *Serratia fonticola*  
**SHV** : Sulphydryl variable  
**SIM** : Seoul imipenemase  
**SME** : *Serratia marcescens* enzyme  
**SMR** : Small Multidrug Resistance  
**SPM** : Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase  
**TEM** : Temoneira  
**TLA** : Tlahuicas Indians  
**TRI** : TEM résistante aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases  
**TSI** : Tri Sugar Iron  
**VEB** : Vietnamese extended spectrum  $\beta$ -lactamase  
**VIM** : Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamases



*Introduction générale*



Depuis l'introduction de la pénicilline et la découverte de l'antibiothérapie et son développement au cours des années quarante du siècle passé (1940), un grand nombre d'agents antibactériens ont été développés et commercialisés à des fins thérapeutiques, permettant de réduire la morbidité ainsi la mortalité consécutives associées aux infections bactériennes observées avant l'ère des antibiotiques (ATB) (Muylaert et Mainil, 2012). C'est grâce aux travaux d'Alexandre Fleming, auteur de la découverte de la première pénicilline en 1928 et de ses collaborateurs Florey et Chain qui ont réussi à extraire la pénicilline de cultures à grande échelle de la moisissure *Penicillium notatum* que cet antibiotique a pu être utilisé pendant la seconde guerre mondiale (Batraud, 2017).

Dès 1945 Fleming constate dans son laboratoire l'apparition d'une résistance à la pénicilline (Batraud, 2017) et dès la première utilisation clinique de la pénicilline pour le traitement des infections à *Staphylocoque aureus*, un groupe scientifique constitué de Ernest Chain, Edward Abraham et Norman Heatley qui a développé la pénicilline, a décrit pour la première fois une enzyme produite par *Escherichia coli*, capable d'hydrolyser la pénicilline lui attribuant le terme de « pénicillinase » (Elhani, 2012). C'est pour cela, Alexandre Fleming a tient un discours lors de la remise de son prix Nobel, insistant sur la bonne utilisation des antibiotiques d'une manière à ne pas favoriser de sous dosage. Par la suite d'autres résistances ont émergé avec l'apparition de nouveaux traitements comme les céphalosporines de première génération (C1G) dans les années 1970, aux céphalosporines de troisième génération (C3G) dans les années 1990 (Batraud, 2017).

Aujourd'hui, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un risque majeur de santé publique, ainsi l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique, placé à l'agenda des agences internationales en charge de la santé humaine (Organisation mondiale de la santé, OMS), de la santé animale (Organisation internationale des epizooties, OIE), de l'agriculture et de l'alimentation (Food and Agriculture Organisation FAO) (Gangoue, 2007; Sanders et al., 2017).

Les  $\beta$ -lactamines demeurent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans la pratique clinique dans le monde, en raison de leur activité élevée, leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules (Charlier et al., 1998; Gangoue, 2007). Et pour cela les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance pour contrecarrer l'action des  $\beta$ -lactamines, entre autre la modification de la cible (Protéines liants Pénicillines); l'acquisition ou la surproduction des pompes efflux pour expulser l'antibiotique en dehors de la cellule; diminution de la

perméabilité de la membrane externe pour une diffusion plus lente des  $\beta$ -lactamines et la synthèse des enzymes de  $\beta$ -lactamases qui sert à inactiver les  $\beta$ -lactamines par modification chimique (**Gangoue, 2007**). Ce phénomène de résistance est dû à l'utilisation anarchique des antibiotiques, les prescriptions inappropriées, doses inadaptées, intervalles ou durées d'administration non respectées, etc., et qui a eu de mauvaises conséquences (**Grare, 2009**).

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent un groupe d'enzymes qui confèrent une résistance à la majorité des  $\beta$ -lactamines (**Vora et Auckenthaler, 2009**) et qui sont inhibées par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique, dont leur dissémination ainsi l'apparition de nouvelles enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées immédiatement à l'usage intensif, inadapté et abusif des ATB dans le domaine de la santé humaine, animale et en agriculture ainsi les échanges commerciaux, les voyages et le tourisme, etc., conduisant à l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR) (**Gangoue, 2007; Grare, 2009; Gharout-Sait, 2016**). De plus, ils présentent un fort potentiel de diffusion à travers le monde car les gènes codant pour ces enzymes sont principalement situés sur des éléments génétiques mobiles, expliquant la rapidité de leur diffusion (**Gharout-Sait, 2016**).

La plus grande partie des  $\beta$ -lactamases a été mise en évidence chez les bacilles à Gram négatif qui sont responsables de la majorité des infections hospitalières (60%) et même communautaires et sont de plus en plus multirésistantes (**Gangoue, 2007**), et leur dissémination concomitante avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines et les quinolones. Les carbapénèmes restent les molécules de premier choix pour le traitement des infections par les bactéries productrices de BLSE (**Vora et Auckenthaler, 2009**).

De ce fait, les objectifs de cette étude étaient de caractériser la résistance aux ATB chez les bacilles à Gram négatif par différents mécanismes et de caractériser les différents types de BLSE ainsi les méthodes de leur détection. Ce manuscrit est organisé en 04 chapitres, pour développer ces aspects. Le premier chapitre est consacré aux antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne, le deuxième chapitre sur  $\beta$ -lactamases, leur mode d'action, classification et leur évolution et le troisième chapitre un aperçu sur Les bacilles à Gram négatif. Vu la situation actuelle stressante à cause de « Covid-19 », nous n'avons pas pu faire le stage pratique au niveau de CHU de Tizi-Ouzou, et pour cette raison nous avons opté de faire une étude théorique analytique comportant le quatrième chapitre, décrit la démarche générale à poursuivre pour détecter phénotypiquement et moléculaires les des  $\beta$ -lactamases.

# *Chapitre 01*



*Les antibiotiques et  
mécanismes de résistance  
bactérienne*



Depuis que l'utilisation des antibiotiques s'est généralisée et leur introduction en thérapeutique dans les années 1940, les résistances bactériennes aux antibiotiques n'ont cessé de s'étendre (**Vernhet et al., 2016**), certaines bactéries ont démontré une résistance partielle ou totale à différents agents antimicrobiens par adaptation et développement des gènes ainsi différents mécanismes de résistance, ce qu'on appelle le phénomène de l'antibiorésistance (**Oie, 2015**).

On terme général, l'antibiorésistance est la capacité d'une bactérie de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques (**Berthuin et Miras, 2018**). Mais il apparaît que ce phénomène a été caractérisé aussi bien par des cliniciens que par des bactériologistes et des généticiens, pour cela, il existe diverses définitions (**Guillot, 1989**), basées sur différents critères génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques. Celles couramment utilisées sont basées sur des critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et cliniques (résistance *in vivo*) (**Muylaert et Mainil, 2012**).

En terme microbiologique, une souche microbienne est qualifiée de résistante lorsqu'elle a l'aptitude de supporter une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la croissance d'autres souches de la même espèce. Cette dernière doit être complétée par celle qui est clinique et même génétique. Cliniquement une bactérie résistante est une bactérie qui échappe au traitement et survit à la thérapie antibiotique, ce qui peut se manifester par un échec clinique (**Guillot, 1989; Muylaert et Mainil, 2012**), dont génétiquement correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie (**Guillot, 1989**).

L'antibiorésistance pourrait devenir l'une des principales causes de mortalité dans le monde (**Laurence Monnoyer-Smith, 2018**). Elle pourrait provoquer un décès toutes les 3 secondes d'ici 2050 (**Berthuin et Miras, 2018**).

## **I.1. Les antibiotiques**

### **I.1.1. Définition**

Sur la base de l'étymologie du mot « antibiotique » ou « antimicrobien », du grec « anti » signifiant : contre, « mikros » : petit et « bios » veut dire la vie, se définit comme toute substance biologique ou composé chimique capable d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostatique) ou les détruire (bactéricide). Ces substances sont produites soit naturellement par les micro-organismes ou obtenues par semi-synthèse ou synthèse chimique par modification de la molécule de base naturelle (**Guardabassi et Courvalin, 2006; Muylaert et Mainil, 2012**), ayant une toxicité sélective pour les procaryotes mais faible pour

eucaryotes. Ils sont utilisés pour traiter les infections, en particulier celles qui sont d'origine bactérienne (Oie, 2015).

### I.1.2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques est basée sur différents critères suivants : (Auckenthaler *et al.*, 1995; Yala *et al.*, 2001).

- Selon l'origine : l'antibiotique est élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- Selon le mode d'action : action sur la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse protéique et la synthèse des acides nucléiques.
- Selon le spectre d'activité : la liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).
- Selon la nature chimique : elle est très variable, basée souvent sur une structure de base, comme exemple le cycle  $\beta$ -lactame, sur laquelle il y a semi synthèse.

Nous nous intéressons de classer les antibiotiques selon leur mode d'action en plusieurs familles, présentées dans les tableaux I, II, III, IV et V.

**Tableau I :** Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne (Kiouba, 2002; Afssaps, 2005; Nauciel et vildé 2005; Grare, 2009; Chouh, 2019).

Famille d'ATB	Groupe/Exemple d'ATB	Spectre d'activité	Mode d'action
<b><math>\beta</math>-lactamines</b>	<b>Pénicillines</b> - Pénicillines A, G, M, E ...(Amoxicilline)	-Variable selon la molécule  -Actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.	Ont une action bactéricide, ils agissent sur la paroi bactérienne spécifiquement sur la synthèse de peptidoglycane en inhibant les PLP qui ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique, ce qui aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi, puis obtenir des formes
	<b>Carbapénèmes</b> - Imipénème - Méropénème		
	<b>Céphalosporines</b> - C1G : Céfalexine - C2G : Céfoxitine - C3G : Ceftazidime - C4G : Céfépime		
	<b>Inhibiteur de <math>\beta</math>-lactamases</b> -Amoxicilline + Acide		

	clavulanique -Pipéracilline + tazobactam		bizarroïdes qui aboutissent à la lyse bactérienne.
	<b>Monobactames</b> - Aztréonam		
<b>Glycopeptides</b>	-Vancomycine - Teicoplanine	-Spectre d'activité étroit réservé aux bactéries à Gram positif.	Action bactéricide, ils inhibent la synthèse de peptidoglycane dans la phase finale par fixation sur le dipeptide terminal (D-Ala-D-Ala) du pentapeptide le précurseur du peptidoglycane, aboutissant à la polymérisation de ce dernier, bloquant ainsi son élongation.
<b>Fosfomycine</b>	- Fosfomycine -Fosfomycinetrométamol	-Bactéries Gram+ -Bactéries Gram-	A une action bactéricide, agit au début de la synthèse de peptidoglycane en bloquant la formation d'acide N-acétylmuraminique par inhibition de pyruvate-UDP-N-acétylglucoseamine-transférase.

**Tableau II** : Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique (Bryskier, 1999; Kiouba, 2002; Wareham et Wilson, 2002; Stratton, 2002; Afssaps, 2005; Singleton, 2005; Grare, 2009).

Famille d'ATB	Groupe/ Exemples d'ATB	Spectre d'activité	Mode d'action
<b>Aminosides</b>	-Streptomycine -Néomycine	-Agit sur les Bactéries Gram- et Gram+	Ont une action bactéricide, ils provoquent une modification morphologique des ribosomes ainsi

	-Amikacine -Gentamicin -Tobramycine -Kanamycine	-Ils sont inactif sur les bactéries anaérobies, les streptocoques et les entérocoques.	une altération de toutes les étapes de la synthèse protéique par fixation sur l'ARNr 16S, au niveau de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, ce qui aboutit à une erreur de lecture de code génétique lors de la traduction protéique.
<b>Macrolides et apparentés</b>	<b>Macrolides vrais</b> -Erythromycine	- Le spectre est étroit, agit sur les cocci Gram+ et Gram- et actifs sur les bactéries intracellulaires.	Ont une action bactériostatique, se fixent sur l'ARN 23S de la S/U 50S, empêchent le transfert du complexe peptidyl-ARNt de site P vers le site A, en inhibant l'élongation de la chaîne peptidique, puis blocage de la formation du pont peptidique et la dissociation précoce du peptidyl-ARNt, hydrolysé par la peptidyl-ARNt hydrolase.
	<b>Lincosamides</b> - Lincomycine		
	<b>Kétolides</b> -Télithromycine		
	<b>Synergistines</b> - Pristinamycine		
<b>Cyclines Tétracycline</b>	-Chlortétracycline -Lymécycline -Métacycline -Oxytétracycline	-Spectre d'activité très large : Bactéries Gram+ et Gram-	Ont une action bactériostatique, ils se fixent sur l'ARN16S de la sous-unité 30S empêchant la liaison de l' aminoacyl-ARNt sur le complexe ARNmribosome.
<b>Phénicolés</b>	-Chloramphénicol -Thiamphénicol	-Bactéries Gram+ -Bactérie Gram-	Ont une action bactériostatique, ils agissent par fixation sur la sous-unité 50S, en inhibant la réaction de transpeptidation par empêchement de la liaison du complexe aminoacyl-ARNt avec son site de fixation.
<b>Oxazolidinone</b>	-Linézolide -Tedizolid	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram-	Ont une action bactériostatique, Ils se fixent sur l'ARN 23S de la sous unité 50S et bloque la formation du

			complexe d'initiation fonctionnel 70S essentiel à la réplication de l'ADN par l'altération du site de fixation de la N-formyl-méthionine-ARNt-synthétase. Ils se fixent aussi sur de l'ARN 16S de la s/unité 30S.
<b>ATB non classé</b>	- Acide fusidique	Bactérie Gram+	A une action bactériostatique, il inhibe la fixation du ribosome au facteur EF-G responsable d'élongation de la traduction, empêchant la fixation des amino-acyl-ARNt.

**Tableau III** : Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques (Gellert, 1976; Hooper, 2001; Yala *et al.*, 2001; Kiouba, 2002; Afssaps, 2005; Van Bambeke, 2008; Grare, 2009; Zink, 2012; Muylaert et Mainil 2013; Ouaidy 2013; Aldred *et al.*, 2014; Chidiac, 2015; Buxeraud et Faure, 2016).

Famille d'ATB	Groupe/ Exemples d'ATB	Spectre d'activité	Mode d'action
<b>Quinolones et Fluoroquinolones</b>	<b>Quinolones de 1<sup>ère</sup> génération</b> -Acide nalidixique -Acide oxolinique	-Bactérie Gram-	Ont une action bactéricide, ils provoquent la mort bactérienne en agissant sur la topo-isomérase de type II (l'ADN gyrase) impliquée dans la réplication et le surenroulement de l'ADN et sur la topo-isomérase IV responsable de détachement des structures de l'ADN nouvellement synthétisée.
	<b>FQ 2<sup>ème</sup> génération</b> -norfloxacin -ciprofloxacine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram-	
	<b>FQ 3<sup>ème</sup> génération</b> -lévofloxacine -sparfloxacine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram-	
	<b>FQ 4<sup>ème</sup> génération</b> -trovafloxacine -moxifloxacine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram-	

<b>Rifamycines</b>	-Rifamycine -Rifamycine SV	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	Ont une action bactéricide, ils bloquent la transcription de l'ADN par inhibition de l'ARN polymérase enzyme responsable de la transcription.
<b>Nitrofuranes</b>	- Nitrofurantoine - Nitrofurantoine - Nifuroxazide	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	Ont une activité statique, ils inhibent les enzymes qui interviennent dans la dégradation du glucose et du pyruvate et perturbent la réplication d'ADN.
<b>Les nitroimidazolés</b>	- Métronidazole - Secnidazole - Tinidazole - Ornidazole	-Bactérie Gram–	Activité bactéricide, la réduction de groupement nitro conduit à la formation des radicaux libres qui provoquent des coupures des brins d'ADN.
<b>ATB non classé</b>	- Novobiocine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	Agit sur l'ADN en inhibant sa réplication.

**Tableau IV :** Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique (Fauchère et Avril, 2002; Afssaps, 2005; Van Bambeke, 2008; INESSS, 2017).

Famille d'ATB	Groupe/ Exemples d'ATB	Spectre d'activité	Mode d'action
<b>Les polypeptides</b>	- Polymyxines B - Colisine - Bacitracine	-Bactérie Gram–	Ont une action bactéricide, ils interagissent avec les phospholipides et pénètrent dans les membranes cellulaires provoquant des changements dans la perméabilité aboutissant à la perturbation des membranes ce qui conduit à la mort cellulaire.

**Tableau V** : Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique (Lambert, 1995; Veyssier, 1999; Afssaps, 2005; Routaboul, 2011; Buxeraud et Faure, 2016).

Famille d'ATB	Groupe/ Exemples d'ATB	Spectre d'activité	Mode d'action
<b>Sulfamides</b>	-Sulfaméthoxazole -Sulfaméthizol -Sulfadoxine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	Ont une action bactériostatique, inhibe la dihydroptéroate synthétase, enzyme nécessaire à la biosynthèse de l'acide folique.
<b>Les 2,4-diaminopyridines</b>	- Triméthoprime - Pyriméthamine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	Agissent sur la dihydrofolate réductase responsable de la transformation de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique.
<b>Sulfamides associés</b>	-Sulfaméthoxazole + Triméthoprime - Sulfadoxine + Pyriméthamine	-Bactérie Gram+ -Bactérie Gram–	L'association permet d'avoir une action bactéricide, ils bloquent la biosynthèse en agissant sur deux étapes de la synthèse du tétrahydrofolate sont perturbées.

## I.2. Types de résistances aux antibiotiques

### I.2.1. Résistance naturelle

Les gènes de résistance naturelle (intrinsèque) aux antibiotiques font partie du patrimoine génétique, ce caractère est présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible ou à l'absence de la cible. Cette résistance naturelle est permanente, d'origine chromosomique, stable et transmise à la descendance (transmission verticale), mais généralement elle n'est pas transmissible par un mode horizontal (Auckenthaler *et al.*, 1995; Sylvie, 2009).

A titre d'exemple, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à gram négatif à la vancomycine est naturelle (Sylvie, 2009).

### I.2.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer une résistance et rendre les bactéries insensibles à un ou un groupe d'antibiotiques (Yala *et al.*, 2001). Cette résistance est souvent instable, mais elle se propage de façon importante dans le monde bactérien (Lozniewski *et al.*, 2010).

Ce type résistance peut être du : soit à une mutation spontanée, soit par acquisition de gènes par un autre micro-organisme (Sylvie, 2009), permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski *et al.*, 2010). Comme exemple les entérobactéries résistantes à l'amoxicilline et *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline M (SARM) (Mangin, 2016).

### I.3. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

#### I.3.1. Mécanismes enzymatiques

##### I.3.1.1. Résistance chromosomique

C'est un phénomène indépendant et rare, dû spontanément à cause d'une mutation et modification au niveau des gènes déjà existants. Cette résistance n'est pas provoquée par la présence de l'antibiotique, mais il détecte la mutation par la sélection des bactéries mutantes résistantes. Ces mutations provoquent des changements ou des modifications des protéines structurales ou enzymatiques qui ont comme résultats l'imperméabilité à un ou plusieurs antibiotiques ou en modifiant les cibles de l'antibiotique, elles sont stables et héréditaires transmissibles par mode vertical (de la cellule mère à la cellule fille) (Perrot, 1998; Scott, 2009; Lozniewski *et al.*, 2010).

##### I.3.1.2. Résistance extra-chromosomique (plasmidique)

C'est un phénomène de transfert de résistance horizontal, très fréquent, entre des espèces phylogéniquement éloignées. Elle peut toucher diverses familles d'antibiotique. Le transfert des gènes de résistances s'effectue lors de leur intégration sur des éléments génétiques mobiles (Davison *et al.*, 2000; Collectif, 2008), des plasmides (cas le plus fréquent), des transposons ou des intégrons, dont les principaux mécanismes de transfert sont : la conjugaison, la transformation, la transduction et la transposition et qui doivent être suivis d'une recombinaison génétique, ils ont pour conséquences différents mécanismes de résistances tels que la diminution de la concentration cellulaire de l'antibiotique, inactivation de l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique ainsi la substitution d'une cible sensible par une cible insensible (Ziai, 2014; El Abdani, 2016). Comme pour la résistance chromosomique, ce phénomène n'est pas induit par l'utilisation des antibiotiques, par contre, ils servent à sélectionner les bactéries porteuses de gènes de résistance. Il est important de

noter que la résistance extra-chromosomique souvent une multirésistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multirésistantes (**Hnich, 2017**).

### I.3.2. Mécanismes non enzymatiques

#### I.3.2.1. Modification de la cible (PLP)

Les PLP (protéines liant les pénicillines), sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et qui sont la cible des bêtalactamines (**El Abdani, 2016**). Ce mécanisme a été décrit pour presque tous les antibiotiques et ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Dans ce type de résistance, différents mécanismes peuvent intervenir :

- a) Diminution ou perte de l'affinité des PLP (**El Abdani, 2016**). Comme exemple chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de la PLP1a (**Gharout-Sait, 2016**).
- b) Augmentation de la synthèse des PLP existantes avec hyper expression de PLP possédant naturellement une faible affinité, ex : *Enterococcus spp* (**El Abdani, 2016**).
- c) Synthèse d'une ou de plusieurs nouvelles PLP insensibles : chez *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, l'acquisition d'un gène (*mecA*), induit la synthèse d'une nouvelle PLP « PLP2a » (**El Abdani, 2016; Battraud, 2017**).

#### I.3.2.2. Diminution de la perméabilité de la membrane externe

La membrane externe des bactéries à gram négatif est constituée de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines (porines et canaux membranaires) qui sont principalement la raison de la perméabilité, en permettant le passage des molécules hydrophiles tel que les antibiotiques (**Pages et Garnotel, 2003**).

Ce mécanisme peut s'effectuer par deux systèmes : la diffusion passive à travers les phospholipides, ou par un transport actif (**Ziai, 2014**) et qui constituent une grande famille de protéines de la membrane externe : OmpF, OmpC, OmpD, PhoE, LamB, OmpA, OmpK36 et Omp36, décrites chez *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* (**Pages et Garnotel, 2003**). Il est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance : efflux et/ou production de  $\beta$ -lactamases (**Gharout-Sait, 2016**). Cette organisation explique le mécanisme de résistance naturelle aux divers antibiotiques comme les pénicillines, les glycopeptides, les macrolides et les quinolones (**Mangin, 2016**). Ce type de résistance est à l'origine d'altération des porines par mutation, soit par une

modification structurale d'une porine, ou par une diminution quantitative ou qualitative des porines (Gharout-Sait, 2016).

### I.3.2.3. Excrétion active de l'ATB par le système d'efflux

Les systèmes d'efflux actifs sont des mécanismes de transmembranaire présents dans toutes les cellules eucaryotes ou procaryotes, connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, sert à expulser des métabolites et des composés toxiques comme les antibiotiques à l'extérieur de la cellule (Pages et Garnotel, 2003; Muylaert et Mainil, 2012), sont spécifiques, conférant une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent contribuer d'une manière significative à la multi-résistance naturelle (intrinsèque) et acquise des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (MDR pour multidrug resistance) (Cattoir, 2004).

Ces pompes à efflux sont classées selon : la spécificité ou non des molécules exportées, leur structure : une à trois protéines, le type d'énergie nécessaire : ATP ou force proton-motrice ainsi le mode d'expression : inductible ou constitutif (Bevilacqua, 2011). L'analyse des séquences et de l'activité de ces pompes permet de déterminer cinq grandes familles : (Pages et Garnotel, 2003).

- ✓ ABC (*ATP binding cassette*) transporteurs.
- ✓ RND (*resistance nodulation cell division*).
- ✓ MFS (*maior facilitator superfamily*).
- ✓ SMR (*small multidrug resistance*).
- ✓ MATE (*multiantimicrobial extrusion*).

Chez les bactéries à Gram négatif qui possèdent une enveloppe complexe, on trouve un système tripartite contenant :

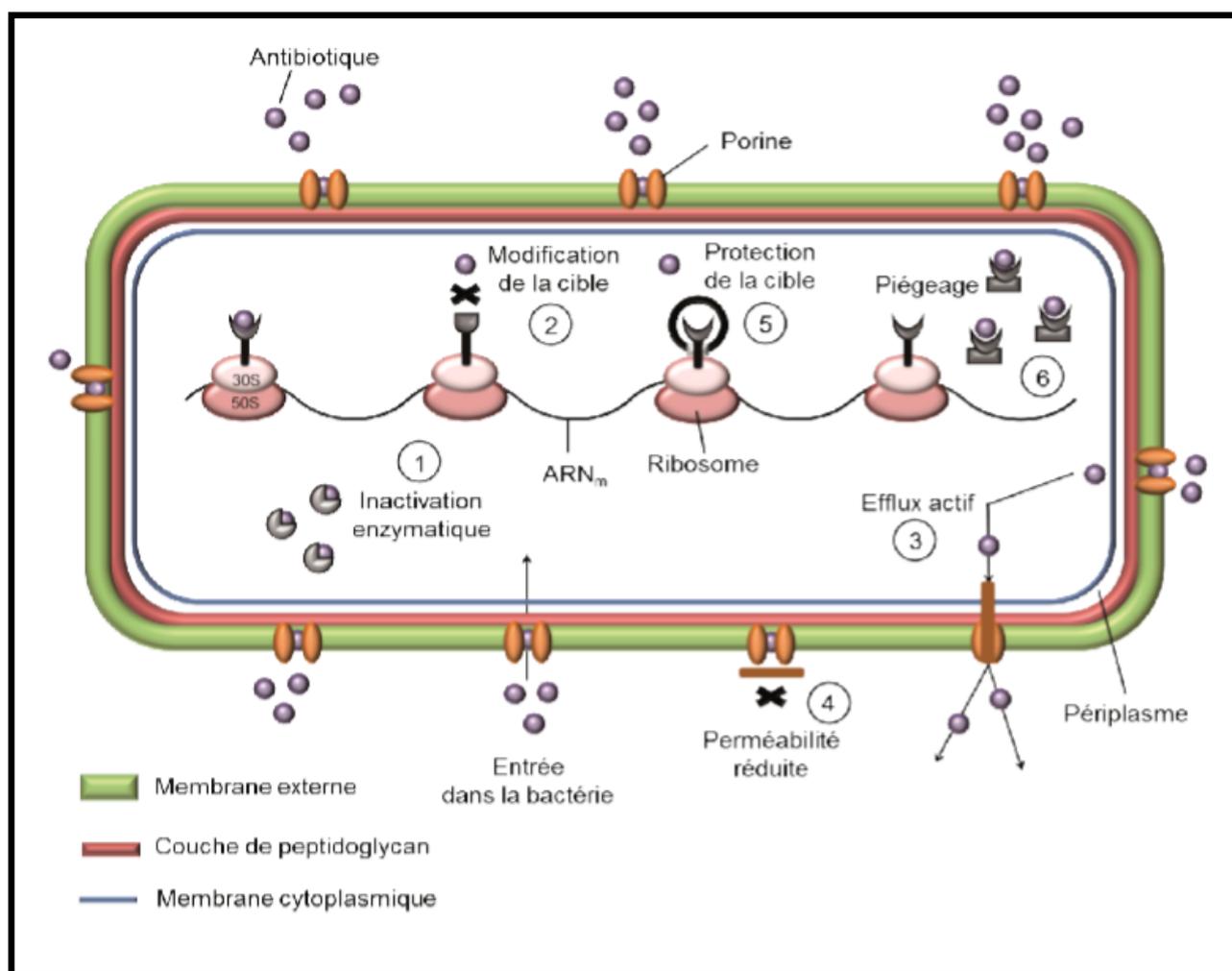
- Une protéine insérée dans la membrane cytoplasmique fournissant l'énergie au transport.
- Une lipoprotéine périplasmique qui assume la liaison/fusion.
- Le canal protéique dans la membrane externe libérant la molécule dans le milieu comme exemple, MexAB/OprM chez *P. Aeruginosa* ou AcrAB/TolC d'*E. coli*, montre une organisation complexe (Pages et Garnotel, 2003).

### I.3.2.4. Production de $\beta$ -lactamases

C'est le mécanisme de résistance le plus efficace et le plus répandu, qui consiste à sécréter une enzyme capable d'inactiver l'antibiotique, concerne les classes majeures d'antibiotiques. Chez les entérobactéries la production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme le

plus fréquent vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines en l'hydrolysant par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame ce qui l'empêche de se fixer sur sa cible (PLP) (Mangin, 2016).

Au début des années 1980 seules quelques enzymes comme TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues, suit à l'introduction des antibiotiques à large spectre tels que les C3G, sont apparues des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Depuis, les  $\beta$ -lactamases ne cessent de se diversifier, d'élargir leur spectre d'activité et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentaires tels que *Pseudomonas spp* et *Acinetobacter spp* (Gharout-Sait, 2016).



**Figure 01:**Résumé des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012).

# *Chapitre 02*



## *Les bêta-lactamases*



Au cours des 70 dernières années, l'utilisation des  $\beta$ -lactamines, incluant les nouvelles  $\beta$ -lactamines comme les C3G et les carbapénèmes, ayant un spectre d'action de plus en plus large envers les bactéries à Gram négatif, a sélectionné des enzymes de type  $\beta$ -lactamases, chacune plus puissante que la précédente (Vallée, 2015). Ces enzymes constituent le mécanisme de résistance le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif. Ils ont été décrits pour la première fois par Abraham *et al* chez une souche d'*E. coli* résistante à la pénicilline (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

### II.1. Définition

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes produites par les bactéries, qui hydrolysent le noyau  $\beta$ -lactame commun à toutes les  $\beta$ -lactamines, rendant l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible. Elles sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

Chez les bactéries Gram+, ces enzymes sont produites dans le milieu extracellulaire (*staphylocoques sp*), ou liée à la membrane externe (mycobactéries), tandis que chez les bactéries à Gram- sont élaborés dans l'espace périplasmique (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

Il existe deux types de  $\beta$ -lactamases :  $\beta$ -lactamases inductibles qui sont des enzymes chromosomiques et  $\beta$ -lactamases constitutives qui sont des enzymes plasmidiques (Boussoulim, 2002).

### II.2. Mode d'action

Les enzymes de  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser d'une manière irréversible la liaison amide de l'anneau (cycle)  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines, aboutissant à la formation d'un acylenzyme, qui sera dégradé en acide inactif, par exemple, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque (Lagha, 2015).

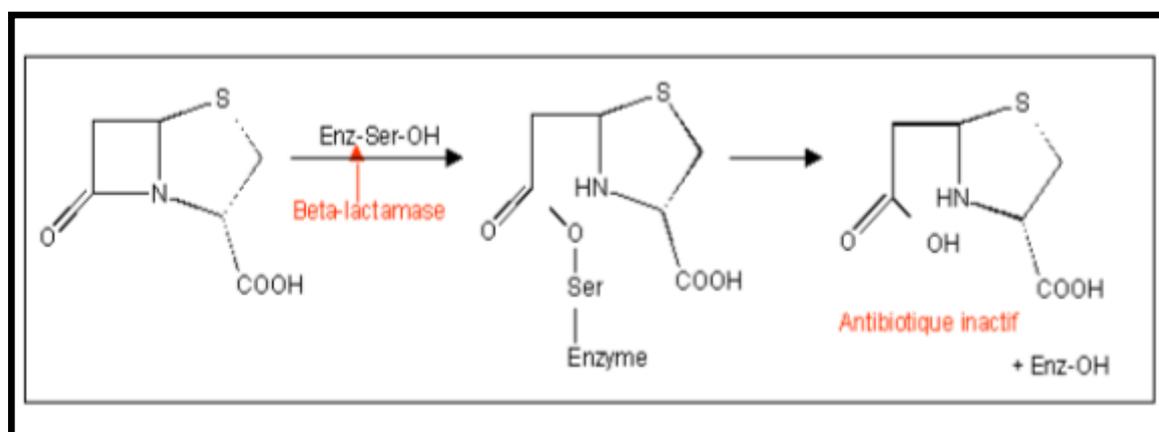


Figure 02 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Lagha, 2015).

Les  $\beta$ -lactamases et les PLP présentent des similarités, la différence entre les deux est la vitesse par laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. Effectivement, si les PLP n'hydrolysent qu'un cycle  $\beta$ -lactame par heure, les  $\beta$ -lactamases peuvent hydrolyser jusqu'à 1000 par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse (Lagha, 2015; Vallée, 2015).

### II.3. Classification

Leur grande diversité et leur importance clinique a amenée à diverses tentatives de classification dès les années 1970 (Philippon, 2016). Parmi les nombreuses classifications proposées, la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros et la classification moléculaire d'Amblar sont les plus pertinentes et les plus utilisées (Foulal, 2013; Lagha, 2015).

#### II.3.1. Classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros

La classification fonctionnelle proposée par Bush *et al.*, en 1995, mise à jour par Bush et Jacoby en 2010, est basée sur le spectre de substrat préférentiel des enzymes et sur leur comportement aux inhibiteurs (Bush et Jacoby, 2010).

- **Le groupe 1** : regroupe les enzymes qui hydrolysent les céphalosporines non inhibées par l'acide clavulanique. Il correspond à la classe C d'Amblar (Boussoualim, 2002).
- **Le groupe 2** : constitué de pénicillinases, de céphalosporinases, de  $\beta$ -lactamases à spectre large, d'oxacillinases et de carbapénèmases. Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique et correspondent aux enzymes appartenant aux classes A et D d'Amblar. Ce groupe est très diversifié, il est subdivisé en sous-groupes en fonction du profil des substrats (Boussoualim, 2002).
- **Le groupe 3** : correspondent à la classe B d'Amblar, il comporte des métallo-enzymes qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique (Boussoualim, 2002).
- **Le groupe 4** : regroupe des enzymes qui ne sont pas encore caractérisées surtout sur le plan structural (Boussoualim, 2002).

#### II.3.2. Classification moléculaire d'Amblar

Cette classification a été proposée dès les années 1980 par Amblar (Philippon, 2016), elle est basée sur les séquences primaires en acides aminés du site actif des  $\beta$ -lactamases, qui sont regroupés en quatre classes A, B, C et D (Aggoun, 2012). Les enzymes des classes A, C et D possèdent une sérine au niveau de leur site actif, intervenant dans le mécanisme de l'acylation au cours de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines (Gangoue, 2007; Bush et Jacoby, 2009) tandis que les enzymes de la classe B sont des métallo enzymes qui nécessitent un ion

métallique bivalent pour l'activité, généralement le zinc ( $Zn^{2+}$ ), plus rarement  $Cd^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  (Hall et Barlow, 2005; Bush et Jacoby, 2009; Soroka, 2016).

➤ **La classe A**

La classe A est la plus diversifiée, comprend les pénicillinases des bactéries à Gram+, les  $\beta$ -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines, les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les C3G et les monobactames. La majorité de ces enzymes sont sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique, sulbactam et tazobactam. Les principaux exemples de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases du type TEM, SHV et CTX-M. Ces enzymes font partie aux groupes fonctionnels 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2<sup>e</sup>, 2f de Bush (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012; Gharout-Sait, 2016).

➤ **La classe B**

Les enzymes de cette classe font partie au groupe fonctionnel 3 de Bush, elle renferme les métallo- $\beta$ -lactamases qui hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques comme l'acide clavulanique, sulbactam, tazobactam. Leur importance clinique est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, ces enzymes sont produites par les bactéries pathogènes telles *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

➤ **La classe C**

Dans cette classe, on retrouve les céphalosporinases résistants à l'acide clavulanique et le sulbactam, mais certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam. Ces enzymes font partie au groupe fonctionnel 1 de Bush, leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram-. Il existe des céphalosporinases chromosomique et plasmidique (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

➤ **La classe D**

Elle regroupe les  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent la cloxacilline et l'oxacilline. Elles sont nommées les oxacillinases, représentées par les  $\beta$ -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactam. Elles font partie au groupe 2d de Bush (Gangoue, 2007; Aggoun, 2012).

## II.4. Evolution des $\beta$ -lactamases

### II.4.1. Les anciennes $\beta$ -lactamases

#### II.4.1.1. Les pénicillinases

Les pénicillinases sont des enzymes adaptatifs produites par certaines bactéries (**Baudet et Hagemann, 1954**). En 1942, *S. aureus* est la première souche résistante à la pénicilline par acquisition d'un plasmide portant un gène codant pour une pénicillinase (**Boyer, 2013**).

Certaines entérobactéries produisent naturellement des pénicillinases à bas niveau et pour cela sont résistantes aux aminopénicillines, carboxypénicillines et aux urédopénicillines et un peu les C1G, mais n'hydrolysent pas les C2G, C3G, C4G, les carbapénèmes et les monobactames (**Boutiba-BenBoubaker, 2009; Chassagne, 2012**). Des pénicillinases acquises peuvent être détectées parmi l'ensemble des entérobactéries, dont l'émergence de souches productrices de pénicillinases plasmidiques à large spectre de type TEM1/2 ou SHV-1 a eu lieu au cours des années 60-70 (**Chassagne, 2012**).

Cette résistance est plus fréquente chez *E. coli* et *P. mirabilis* que chez les autres espèces d'entérobactéries. L'expression des pénicillinases acquises peut être faible pour les aminopénicillines et carboxypénicillines ou forte pour un ensemble des pénicillines, les C1G et parfois les C2G. Une résistance aux pénicillines associées aux IBL a été observée à cause d'une mutation ponctuelle (**Chassagne, 2012**).

#### II.4.1.2. Les $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV et OXA

Plusieurs  $\beta$ -lactamases ont été enregistrées chez les bacilles à Gram négatif. Chez les entérobactéries l'enzyme la plus courante est la TEM-1, qui est responsable de la résistance à l'ampicilline dans environ 50% des isolats d'*E. coli* (**Livermore, 1995**). Les  $\beta$ -lactamases de type SHV ont longtemps été endémiques au genre *Klebsiella*, avec un profil de résistance similaire aux  $\beta$ -lactamases de type TEM (**Medboua, 2011**). De nombreux types d'OXA ont été enregistrés chez *P. aeruginosa*, ce type d'enzymes sont faiblement résistants aux pénicillines et sensible à la pipéracilline-tazobactam (**Livermore, 1995**).

#### II.4.1.3. $\beta$ -lactamases a spectre étendu (BLSE)

Les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases de classes A ou D d'Ambler, conférant une résistance aux pénicillines, C1G, C2G et C3G et l'aztréonam, mais ne confèrent pas de résistance aux céphamycines et carbapénèmes (**Gharout-Sait, 2016**). Ils sont inhibés par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique. Ces enzymes sont caractérisés par une grande diversité (**Gangoue, 2007**).

Les BLSE ont été décrites pour la première fois chez *Klebsiella ozaeniae*, en 1983 en Allemagne, puis en 1984 chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Gangoue, 2007). Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1/2 et de SHV-1 après évolution de ces enzymes anciennes par mutations ponctuelles. A partir de 1995, de nouvelles BLSE notamment CTX-M ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries qui sont responsables d'infections nosocomiales, les autres BLSE comme exemple PER, VEB, etc., restent plus rares et sont principalement détectées chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp* (Cattoir, 2008).

### Les BLSE de type TEM

En 1965, la première  $\beta$ -lactamase plasmidique de type TEM-1 a été décrite chez les bactéries à Gram négatif en Grèce, cette enzyme a été produite par une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira d'où la nomination (Elhani, 2012).

De nombreux dérivés de TEM-1/2 (>222) ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE (Gharout-Sait, 2016), le plus souvent retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. Les BLSE de type TEM ont été également rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa*, les exemples les plus couramment retrouvés au sein de cette famille sont TEM-3, TEM-4, TEM-24 et TEM-52 (Cattoir, 2008).

Certains dérivés de l'enzyme TEM ont été formés à cause des mutations ponctuelles de l'enzyme originale, ces mutations responsables des substitutions d'acides aminés a lieu au niveau de quatre positions de la protéine (104, 164, 238 ou 240) conduisant à l'élargissement de spectre de ces enzymes. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, comme elles peuvent conférer une résistance aux inhibiteurs, à titre d'exemple TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs) (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006; Cattoir, 2008; Elhani, 2012).

### Les BLSE de type SHV

Les BLSE de type SHV (Sulfhydryl variable) dérivent toutes de SHV-1 par mutations ponctuelles au niveau de positions 238 et 240. Ces enzymes sont d'origine présente chez l'espèce *K. pneumoniae*, elles ont été également détectées parmi de nombreuses entérobactéries telles *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp*. Plus de 100 variants de BLSE de type SHV ont été décrits, les plus fréquents sont SHV-12, SHV-2 et SHV-5 (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006; Cattoir, 2008; Elhani, 2012).

## II.4.2. Les nouvelles $\beta$ -lactamases

### II.4.2.1. BLSE de type CTX-M

Ce sont des  $\beta$ -lactamases de classe A qui tiennent leur nom de leur capacité d'hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la ceftazidime « CTX » et « M » pour leur lieu d'isolement (Munich) (**Ruppé, 2010**).

En 1986, la première BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich) a été décrite chez une souche d'*E. coli* au Japon. Plus de 110 variants de CTX-M ont été décrits et classés en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63, CTX-M-9, CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45. Ces nouvelles BLSE ne sont pas étroitement liées aux  $\beta$ -lactamases de type TEM ou SHV puisqu'elles ne présentent que 40 % d'homologie avec ces BLSE classiques (**Bonnet, 2004; Elhani, 2012**).

La plupart des souches productrices de CTX-M sont non seulement résistantes à la majorité des  $\beta$ -lactamines, mais également à de nombreuses familles d'antibiotiques comme les fluoroquinolones, les aminosides, le cotrimoxazole, les tétracyclines ou encore le chloramphénicol (**Ruppé, 2010**).

### II.4.2.2. BLSE de type PER

PER-1 a été initialement détecté en 1993 dans un isolat de *P. aeruginosa* provenant d'un patient turc hospitalisé en France. Cette enzyme est faiblement liée aux autres BLSE et confère une résistance aux pénicillines, au céfotaxime, à la ceftazidime et à l'aztréonam, mais épargne les carbapénèmes et les céphamycines. Son activité est bien inhibée par le clavulanate, le sulbactam et le tazobactam. Le gène *bla*<sub>PER-1</sub> est répandu chez *Acinetobacter spp.* et *P. aeruginosa*, mais peuvent également être isolés de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium et *Providencia rettgeri* en Turquie (**Naas et al., 2008**).

En 1996, une enzyme apparentée « PER-2 » qui présente une homologie de 86% des acides aminés avec PER-1, a été trouvée chez des souches de *S. enterica* sérovar Typhimurium en Argentine et par la suite dans d'autres bactéries à Gram négatif. Enfin, il a été signalé qu'une souche de *P. aeruginosa* produisant à la fois PER-1 et la carbapénémase VIM-2 a été détectée en Italie (**Naas et al., 2008**).

### II.4.2.3. BLSE de type VEB

L'enzyme VEB-1, a été signalé pour la première fois en 1996 par rapport à un isolat d'*E. coli* provenant d'un patient vietnamien, VEB-1 possède la plus haute identité avec PER-1 et PER2 (38%) et confère une résistance de haut niveau à la ceftazidime, au céfotaxime et à l'aztréonam. Cette enzyme est également bien inhibée par le clavulanate, le sulbactam et le tazobactam, ainsi que par le moxalactam, l'imipénème et la céfoxitine (**Naas et al., 2008**).

Quatre dérivés mutants ponctuels de VEB-1 (VEB-2 à -5) ont été décrits. Après sa découverte initiale, le gène *bla*<sub>VEB-1</sub> a été détecté chez de *P. aeruginosa* en provenance de Thaïlande et au Vietnam. Dans ces pays, jusqu'à 40% et 80% des isolats d'entérobactéries de *P. aeruginosa* respectivement résistantes à la ceftazidime étaient positifs pour *bla*<sub>VEB-1</sub> (Naas *et al.*, 2008).

#### II.4.2.4. BLSE de type OXA

Les BLSE de type OXA ont été initialement découverts dans des isolats de *P. aeruginosa* Turquie (Livermore, 2008; Naas *et al.*, 2008), qui sont nommées en raison de leurs capacités d'hydrolyse des pénicillines M (l'oxacilline et cloxacilline). Elles surviennent principalement chez *P. aeruginosa* mais ont été détectées dans de nombreuses autres bactéries à Gram négatif, dont les Enterobacteriaceae (Cattoir, 2008; Naas *et al.*, 2008).

Des variantes d'OXA aient une résistance accrue à une ou plusieurs oxyimino-céphalosporines, elles sont mal inhibées par le clavulanate (Livermore, 2008). La plupart des  $\beta$ -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de manière significative les céphalosporines à spectre élargi. Ils dérivent d'OXA-10 ou OXA-13, ou dans une moindre mesure, de l'OXA-2. La plupart des BLSE dérivés de l'OXA-10 confèrent une plus grande résistance au céfotaxime et une résistance significative à l'aztréonam, dont la résistance à la ceftazidime est dû à des mutations, souvent des substitutions au niveau de Gly167 (Poole, 2004; Naas *et al.*, 2008).

#### II.4.2.5. Autres types de BLSE

D'autres types plus rares de BLSE, appartenant à la classe A, incluent BES, GES-IBC, SFO, TLA et BEL (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006), qui ne sont étroitement liés à aucune des trois familles de BLSE de type TEM, SHV ou CTX-M car, ils ne sont pas de simples dérivés mutants ponctuels de  $\beta$ -lactamases connues, à l'exception de SFO-1, leurs gènes progéniteurs restent inconnus (Naas *et al.*, 2008).

Ces types d'enzymes sont inhibés par l'acide clavulanique. Les exemples incluent BES-1, SFO-1 et TLA-1 ont été retrouvées chez les entérobactéries. Tandis que les types GES et IBC-2, ont été largement retrouvés chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, également chez les entérobactéries (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

#### II.4.3. Les céphalosporinases

Il existe des céphalosporinases chromosomiques et des céphalosporinases plasmidiques.

### II.4.3.1. Les céphalosporinases chromosomiques

Chez les entérobactéries, la résistance acquise aux C3G, est décrite depuis 1985 et elle peut être liée à la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, en particulier lors d'hyperproduction d'enzymes chromosomiques appartenant à la classe C « AmpC » ou « céphalosporinase » (**Rhimi-Mahjoubi et al., 2002**). On distingue les céphalosporinases chromosomiques constitutives et les céphalosporinases chromosomiques inductibles.

Les céphalosporinases chromosomiques constitutives, l'expression de gène d'AmpC est généralement à très bas niveau chez *E. coli*, *Shigella* et *P. mirabilis* (**Philippon et al., 1989; Ben Meziane et Aroun, 2012**). Ça entraîne une sensibilité aux aminopénicillines, à leur association au clavulanate et/ou aux C1G. Chez *E. coli* l'hyperproduction d'enzyme AmpC provoque une résistance à diverses  $\beta$ -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les C3G, l'aztréonam et aux combinaisons des pénicillines avec les I $\beta$ L. Cette hyperproduction peut se produire par amplification du gène ampC ou des mutations dans le promoteur et / ou l'atténuateur, ce qui augmente le taux de transcription du gène (**Ayad, 2017**).

Pour les céphalosporinases chromosomiques inductibles, ont été trouvés chez pas mal d'espèces d'entérobactéries telles que *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* (**Philippon et al., 1989; Ben Meziane et Aroun, 2012**). Ces enzymes sont exprimés à haut niveau, dont leur synthèse est codée par le gène ampC qui est contrôlée par un système de régulation comprenant les protéines AmpR, AmpD et AmpG (**Faure, 2009**). Le phénotype de résistance est marqué par une résistance aux C1G et aux aminopénicillines associées ou non aux inhibiteurs. L'hyperproduction d'une céphalosporinase confère une résistance à au moins une C3G. Une résistance est observée à toutes les pénicillines associées ou non aux inhibiteurs ainsi qu'à toutes les C2G et aux céphamycines. Généralement les C4G et les carbapénèmes ne sont pas touchés (**Gharout-Sait, 2016**).

### II.4.3.2. Les céphalosporinases plasmidiques

Les premières céphalosporinases plasmidiques ont été découvertes en 1988 aux Etats-Unis et à la Corée du Sud, dans des souches cliniques de *K. pneumoniae*. L'émergence de ces enzymes a été découverte par la suite chez diverses espèces d'entérobactéries naturellement AmpC telles *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. enterica* et *P. mirabilis* (**Haytham, 2015; Philippon et al., 2016**).

Les mutations aboutissant à une transformation de la protéine AmpR et à une hyperproduction continue, stable et transmissible à la descendance de la céphalosporinase

AmpC. Cette hyperproduction confère une résistance élevée vis-à-vis les carboxypénicillines, les Uréidopénicillines, les C3G et l'aztréonam. Seuls les carbapénèmes, le mércillinam, la céfépime et le ceftiorome, qui sont relativement stables à l'hydrolyse par les céphalosporinases AmpC. Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam sont inactifs ou peu actifs sur les enzymes AmpC (Cavallo *et al.*, 2004).

Les gènes AmpC codés pour les plasmides ont été trouvés dans le monde entier dans des isolats nosocomiaux et non nosocomiaux (Jacoby, 2009). Le premier exemple d'AmpC plasmidique découvert est celui de MIR-1 chez *K. pneumoniae* aux Etats-Unis. Depuis, plusieurs céphalosporinases ont été mises en évidence chez les entérobactéries, dont la plus nouvelle est le type ACC-1, chez une souche de *K. pneumoniae* en Allemagne (Rhim-Mahjoubi *et al.*, 2002). CMY-2 est la céphalosporinase plasmidique la plus répandue dans le monde, elle est codée par le gène *bla*<sub>CMY-2</sub> (Haytham, 2015).

#### II.4.4. Les carbapénèmases

Les carbapénèmases constituent le mécanisme de résistance le plus important chez les entérobactéries, sont principalement codés par des plasmides et pour cela, ils sont associés aux multirésistances. Ces enzymes appartiennent aux classes A, B et D d'Ambler (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011). Actuellement, les plus importantes cliniquement sont les  $\beta$ -lactamases de type KPC, IMP/VIM5 et OXA-48 chez les entérobactéries (Nordmann, 2010).

##### ➤ Carbapénèmases de classe A

Décrites au milieu des années 1980, ils ont été rapportés dans des espèces d'entérobactéries nosocomiales comme *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ou *Klebsiella spp*. Il existe des carbapénèmases de classe A chromosomiques (SME, NMC et IMI) et plasmidique (KPC, GES) (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011).

Elles sont capables d'hydrolyser une grande variété de  $\beta$ -lactamines y compris les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes. Leur activité hydrolytique est partiellement inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam. Ce sont des enzymes plasmidiques, ce qui leur a permis de diffuser dans de nombreuses espèces comme *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011).

##### ➤ Carbapénèmases de classe B

Sont des métallo- $\beta$ -lactamases qui hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztréonam. A *contrario* d'autre  $\beta$ -lactamases, ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions de zinc présents au

niveau du site actif. Il existe une grande variété de MBL regroupées dans plusieurs familles : VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011). Les types VIM et IMP sont les plus répandues dont l'hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* et les niveaux d'expression de la résistance sont variables (Nordmann, 2010).

➤ **Carbapénèmases de classe D**

La première carbapénémase de type OXA a été décrite en 1993, chez d'*A.baumannii*. Cette enzyme plasmidique fut nommée « *Acinetobacter resistant to imipenem* » (ARI-1), puis renommée OXA-23 après séquençage. Il existe neuf sous-groupes de carbapénèmases de classe D (OXA-23, OXA-51, OXA-24, OXA-58, OXA-48, OXA-55, OXA-50, OXA- 62 et OXA-60), basés sur l'homologie des séquences protéiques. (Grall *et al.*, 2011). OXA-48, a été identifiée initialement chez *K. pneumoniae* en Turquie (Nordmann, 2010; Grall *et al.*, 2011).

Les autres carbapénèmases de type OXA sont principalement retrouvées chez *Acinetobacter spp*, alors que l'OXA-48 n'a été décrit que chez les entérobactéries. Ces enzymes hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypénicillines, et partiellement l'imipénème, leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (Grall *et al.*, 2011).

## *Chapitre 03*



Les bactéries à Gram négatif constituent une large catégorie de micro-organismes. Généralement, cette catégorie forme deux grands groupes : les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires, occupant une place très importante en pathologie humaine car elles sont responsables de diverses maladies infectieuses communautaires et en milieu hospitaliers (Liassine, 2000; Achkour, 2012).

### III.1. Les entérobactéries

#### III.1.1. Définition

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries très hétérogène. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma enterobacteriaceae (Joly et Reynaud, 2002; Madigan et Martinko, 2007; Cristian, 2008). L'hybridation ADN-ADN a évalué plus de 140 espèces (SOMIPEV, 2017), dont les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia* (Denis et al., 1998).

En général ces bactéries sont les hôtes principaux de tube digestif de l'Homme et des animaux, ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène ou à l'état de commensal (El Bouamri, 2017). Les différences entre ces nombreuses espèces bactériennes viennent de critères plus précis, tels que la fermentation des sucres, la production ou non de sulfure et la production d'enzymes du métabolisme (Exemple : les désaminases et les décarboxylases) (El Bouamri, 2017).

#### III.1.2. Caractères bactériologiques des entérobactéries

##### ➤ Caractères morphologiques

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, de 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6µm de large, droites, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Elles possèdent des fimbriae qui sont des facteurs d'adhésion et pili sexuels, qui interviennent dans le transfert du matériel génétique. Certaines espèces d'entérobactéries, comme *Klebsiella pneumoniae*, peuvent être entourées d'une capsule qui leur confère la virulence (Minor, 1989; El Bouamri, 2017).

##### ➤ Caractères culturels

Les entérobactéries sont de culture aisée, aérobies-anaérobies facultatives. La température optimale de croissance est entre 35° à 37°C après 18-24 heures d'incubation, les colonies formées présentent de différents aspects, en général elles sont bombées, rondes et régulières, leur surface est lisse et brillante, de structure homogène de type « smooth » ou S,

cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche, rugueuse de type « rough » ou R (Achmour, 2012; El Bouamri, 2017).

➤ **Caractères biochimiques**

Grâce à leur grande diversité enzymatique, les entérobactéries possèdent de nombreux caractères biochimiques dont leur identification repose sur ces derniers. Ces caractères sont appelés les caractères de différenciation (Joly et Reynaud, 2002; El Bouamri, 2017).

Les principaux caractères biochimiques communs sont : la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz ; réduction des nitrates en nitrites ; oxydase négative ; catalase positive (à l'exception de *Shigella dysenteriae* sérotype 1). Les caractères d'identification biochimiques des entérobactéries sont représentés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** Les caractères d'identification biochimiques des genres d'entérobactéries les plus fréquemment rencontrés (El Bouamri, 2017).

	<i>Salmonalla</i>	<i>Citrobacter Freundii</i>	<i>Levinea</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Enterobacter Cloaceae</i>	<i>Hafnia Alvei</i>	<i>Serratia Marcescens</i>	<i>Proteus Vulgaris</i>	<i>Proteus Mirabilis</i>	<i>Proteus Morganii</i>	<i>Proteus Rettgari</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Pseudotuberculosis</i>
<b>Mobilité</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lactose</b>	-	+ou (+)	-	+ou (+)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ONPG</b>	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>LDC</b>	+	-	-	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>ODC</b>	+	-	+	d	d	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<b>ADH</b>	-	-	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Uréase</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>TDA, PDA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Indole</b>	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	+	-	+	+	D	-	-
<b>Citrate de Simmons</b>	+	+	+	-	-	+	+	d*	+	D	d	-	+	+	-	-	-
<b>Malonate</b>	-	-	d	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VP</b>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	-	-	-	d*	-	-

<b>Gélatinase</b>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	-	-	-	d*	-	-
<b>Gaz/glucose</b>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d	d	-	-	-
<b>Mannitol</b>	+	+	+	d	d	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+	+
<b>Rhamnose</b>	+	+	+	d	d	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	+	+
<b>Saccharose</b>	-	d	d	d	-	+	+	-	+	+	d	d	-	d	+	-	-
<b>Arabinose</b>	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	d	d
<b>Inositol</b>	d	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-	-
<b>Aldonitol</b>	-	-	d	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-	-
<b>Galacturonate</b>	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	d	d

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

d : différents types biochimiques

+\* et d\* : positif à 22°C, négatif à 37°C

+\* : positif lent (uréase+ en 18-24 heures)

(+) : positif en 3 à 7 jours

#### ➤ Caractères antigéniques

Les différents caractères antigéniques permettent de classer les souches appartenant à la même espèce ou au même genre en différents sérotypes (Avril *et al.*, 2000).

✓ **L'antigène de Kunin (commun)** : dénommé aussi ECA (Enterobacterial Common Antigen). Il existe chez toutes les entérobactéries sauf certaines *Erwinia*, a un intérêt taxonomique (Bidet et Bingen, 2007; Livrelli *et al.*, 2007).

✓ **L'antigène O (somatique)** : localisé au niveau de la paroi bactérienne, il est de nature lipopolysaccharidique (LPS) complexe, contenant une endotoxine très toxique. Ils sont thermostables et résistent à l'alcool ou l'acide (Bactériologie, 2003; Ndiaye, 2005).

✓ **L'antigène H (flagellaire)** : c'est un antigène pas toxique (Bactériologie, 2003), il n'est présent que chez les souches mobiles. Constitué d'une protéine spécifique dite « la flagelline », ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool (Bidet et Bingen, 2007).

✓ **Les antigènes de surface :**

1. **L'antigène K (capsulaire)** : il est de nature polysaccharidique ou protéique (Livrelli *et al.*, 2007), chez certaines entérobactéries telles *E. coli*, *Shigella*, cet antigène est appelé « Vi », il masque l'antigène O pour la virulence (Bactériologie, 2003).

2. **L'antigène d'adhérence (adhésine)** : porté par des pili communs ou fimbriae, il est de nature protéique (Bidet et Bingen, 2007).

### III.1.3. Identification

L'identification des entérobactéries repose sur différentes techniques à savoir l'examen macroscopique et microscopique et l'étude des caractères biochimiques avec des microméthodes d'identification commercialisées sous forme de kit comme exemple la galerie API20E et le test Micro CSB System ENTERO, permettant de faire un diagnostic différentiel (Bakhoum, 2004).

La spectroscopie de masse MLADI-TOF, constitue également une meilleure technique pour une identification rapide d'espèce à partir de colonies, de culture en bouillon ou même de prélèvement, et qui utilise l'analyse des protéines bactériennes. Les études comparant la spectrométrie de masse avec l'identification moléculaire (séquençage du gène de l'ARN 16S) ont montré une excellente concordance des deux méthodes pour l'identification des Enterobacteriaceae (Bidet et Bingen, 2007).

De plus, la résistance naturelle aux antibiotiques est aussi d'une grande aide à la démarche d'identification des entérobactéries. Toute divergence entre l'identification biochimique et le phénotype de résistance doit interpeller le biologiste et l'amener à vérifier l'identification du germe (Bidet et Bingen, 2007).

### III.1.4. La résistance aux antibiotiques

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques est variable selon l'espèce et leur origine (SOMIPEV, 2017).

#### ➤ La résistance naturelle

La résistance naturelle délimite le spectre naturel de l'antibiotique, elle se traduit habituellement par des CMI supérieures à la valeur critique basse de concentration de l'antibiotique concerné (CFA-SFM, 2018).

Les entérobactéries sont classiquement divisées en 4 classes : celles qui ne produisent pas naturellement de  $\beta$ -lactamase comme *Salmonella* et *P. mirabilis* ou produisent une céphalosporinase à très bas niveau comme *E. coli* et *Shigella* (classe 1) ; celles qui produisent naturellement une pénicillinase comme *Klebsiella*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* (classe 2) ; celles qui produisent naturellement une céphalosporinase (classe 3) ; celles qui produisent à la fois une pénicillinase et une céphalosporinase comme *Y. enterocolitica* (classe 4) (annexe 1) (Bidet et Bingen, 2007).

**Tableau VII : Résistances naturelles des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (Debabza, 2015; SOMIPEV, 2017).**

Espèce	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Groupe de $\beta$ -lactamine	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>C. diversus</i> <i>Levinea</i>	<i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> « non <i>diversus</i> », <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
<b>Amino</b>	S	R	R	R
<b>Carbox</b>	S	R	S	R
<b>Uréido</b>	S	I	S	I
<b>C1G</b>	S	S	R	R
<b>C3G</b>	S	S	S	S
<b>Carbaménèmes</b>	S	S	S	S
<b>Mécanismes de résistance</b>	BL-	Pase	Case	Pase + Case

**Amino** : aminopénicillines, **Carbox** : carboxypénicillines, **Uréido** : uréidopénicillines **C1G** : céphalosporines de première génération, **C3G** : céphalosporines de troisième génération, **BL-** : absence de  $\beta$ -lactamases, **Pase** : pénicillinase, **Case** : céphalosporinase, **S** : sensible, **R** : résistant, **I** : intermédiaire

#### ➤ Résistances acquises

Chez les entérobactéries, la résistance acquise aux antibiotiques est reposée sur l'expression de divers types de  $\beta$ -lactamases, c'est le mécanisme le plus fréquent et le plus efficace. (Debabza, 2015; SOMIPEV, 2017).

**Tableau VIII** : Résistances acquise des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines (Debabza, 2015).

Marqueur	Pase BN	Pase HN	TRI	Case BN	Case HN	BLSE
<b>AMX</b>	R	R	R	R	R	R
<b>AMC</b>	S	I/R	R	R	R	R
<b>TIC</b>	R	R	R	S	R	R
<b>MEC</b>	S	R	R	S	S	R
<b>CF</b>	S	R	S	R	R	R
<b>CAZ</b>	S	S	S	S	R	R

**AMX** : amoxicilline, **AMC** : amoxicilline-acide clavulanique, **TIC** : ticarcilline, **CF** : céfalotine, **CAZ** : céftazidime, **Pase BN** : pénicillinase de bas niveau, **Pase HN** : pénicillinase de haut niveau, **TRI** : pénicillinase résistante aux inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, **BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi, **MEC** : mécilinam, **I/R** : intermédiaire à résistant.

## III.2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires

### III.2.1. Définition

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNnF) sont des bactéries aérobies ubiquitaires, Ils sont isolés de l'environnement (eaux douces et de mer, sol, poussières en suspension dans l'air), ils contaminent notamment les végétaux et l'alimentation et sont également retrouvés au niveau du tractus digestif des animaux. Ces bactéries ayant peu d'exigences nutritives survivent et se multiplient dans les milieux humides, notamment dans l'environnement hospitalier. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales et de pathologies sévères (**Berthelot et al., 2005; Martin, 2007**).

Ces bactéries se cultivent sur des milieux ordinaires, elles ont un métabolisme respiratoire strict car elles utilisent l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose. Ces bacilles à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres en anaérobiose et sont qualifiés de « non fermentants » ou « non fermentaires » (**Martin, 2007**).

Dans un laboratoire de bactériologie médicale, 10 à 15 % des bacilles à Gram négatif isolés sont des bacilles non fermentaires et les trois quarts appartiennent à l'espèce *P. aeruginosa* (**Martin, 2007**). Outre la famille des Pseudomonadaceae, les BGNnF comportent aussi *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium* et *Sphingobacterium* (**Berthelot et al., 2005**).

### III.1.2. Caractères bactériologiques des bacilles à Gram négatif non fermentaires

#### ➤ Caractères morphologiques

Les *Acinetobacter* sont des bactéries immobiles souvent regroupées en diplobacilles à extrémités arrondies de forme courte et trapus (coccobacilles). Les *Pseudomonas* apparaissent comme des bacilles longs à extrémités effilées, contrairement aux autres bacilles non fermentaires (*Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, etc.), possèdent des extrémités plus arrondies (**Martin, 2007; Achkour, 2012**), sont des bactéries immobiles ou mobiles avec un cil ou monotriche ([microbes-edu.org/etudiant/bgn.html](http://microbes-edu.org/etudiant/bgn.html)).

#### ➤ Caractères cultureux

Toutes les bactéries non fermentaires sont aérobies strictes (**Martin, 2007**), se développant entre 4 et 41 °C, mais variable selon l'espèce (**Berthelot et al., 2005**). Leur croissance est parfois plus lente que celle des entérobactéries, surtout à 37 °C, en raison d'une température optimale de croissance à 30 °C avec un temps d'incubation de 48 à 72 heures (**Martin, 2007**).

L'observation d'une pigmentation des colonies ou la diffusion de pigment dans le milieu de culture peut orienter vers certains genres permettant leur identification (**Martin, 2007**).

- La pyocyanine, pigment bleu-vert, est pathognomonique de *P. aeruginosa*.
- Des pigments allant du jaune pâle au jaune orangé peuvent être produits par diverses espèces au sein des genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Xanthomonas* (**Achkour, 2012**).

#### ➤ Caractères biochimiques

Les BGNnF forment un groupe de bactéries très souvent oxydase positive (**SOMIPEV, 2017**), mais négative pour certaines espèces. Le caractère non fermentaire d'une souche peut être visualisé sur un milieu Kligler Hajna ou TSI sur lequel sera détectée une culture uniquement sur la pente sans production de gaz (**Martin, 2007**), ils dégradent les sucres en acidifiant peu au contact de l'oxygène ([microbes-edu.org/etudiant/bgn.html](http://microbes-edu.org/etudiant/bgn.html)). Certaines espèces peuvent, en anaérobiose, utiliser les nitrates comme accepteur final d'électron et ainsi respirer les nitrates (Annexe 2) (**Martin, 2007**).

### III.1.3. Identification

Les systèmes d'identification utilisent des cartes ou des galeries « universelles Gram négatif » ou adaptées à ce groupe (**Martin, 2007**).

1. La galerie API 32GN® permet la détection de la croissance de la souche à identifier en présence de 32 sources de carbone. Cette galerie identifie une quarantaine de taxons avec un pourcentage d'identification satisfaisant (>90 %).
2. La carte d'identification Vitek 2 GN® permet l'identification d'une vingtaine des taxons les plus couramment rencontrés en bactériologie médicale de bacilles non fermentaires à partir de 41 épreuves biochimiques. Les résultats sont obtenus en moyenne après 6 heures d'incubation.
3. La galerie API 20NE® comporte 8 épreuves conventionnelles et 12 épreuves auxanographiques. Cette galerie permet l'identification de plus d'une quarantaine d'espèces de bacilles non fermentaires après incubation de 48 heures à 30 °C.
4. À partir de la détermination de 18 caractères enzymatiques, la galerie RapID NF Plus Panel® permet l'identification d'une cinquantaine de taxons en 4 heures. Ce système nécessite l'adjonction de réactifs dans certaines cupules (nitrate réductase, production d'indole).

### III.2.4. La résistance aux antibiotiques

Les BGNnF sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance comme pour les  $\beta$ -lactamines, les aminosides

et les fluoroquinolones, elles sont capables de résister à de nombreux antibiotiques grâce à une membrane externe peu perméable et grâce au développement de nombreux mécanismes de résistances ( $\beta$ -lactamases, imperméabilité sélective ou non en relation avec les porines, modification des protéines liant la pénicilline, modification d'affinité de certaines enzymes...) (Annexe 3) (**Debabza, 2015**).

# *Chapitre 04*



## *Méthodes de détection des béta-lactamases*



### IV.1. Présentation de l'étude

La réalisation de notre étude a été prévue au niveau de Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, dont l'objectif de travail portant sur :

- L'étude et évaluation de la résistance des bacilles à Gram négatif vis-à-vis différentes classes d'antibiotiques, recherchés dans laboratoire microbiologique de l'hôpital et isolé à partir de divers prélèvements biologiques issus des patients hospitalisés admis dans différents services suivants : infectiologie (prélèvement urinaire, selles, sperme, prélèvement vaginale, etc.) réanimation (sécrétions bronchiques, biopsies bronchiques et transbronchiques, prélèvement d'organes, etc.) et hématologie (prélèvement sanguin).

Vu la situation actuelle inquiétante, compte tenu de l'évolution et la propagation de l'épidémie de « COVID-19 » d'heure en heure, conduisant à l'arrêt des études supérieures, l'ampleur de la perturbation de l'enseignement, de l'apprentissage et la recherche ainsi la pénalisation de nombreux étudiants dont les stages pratiques ont été annulés, afin de garantir la mise en œuvre des mesures de protection nécessaires pour assurer la sécurité des étudiants. A cet égard, nous n'avons pas pu faire notre stage pratique au niveau de CHU de Tizi-Ouzou, et pour cette raison, on a opté de faire une étude théorique qui permettra la validation, dans laquelle on va décrire les étapes à suivre en se basant sur des travaux précédents et données bibliographiques.

La démarche adoptée est comme suit :

- Recueil des données : par réalisation d'un questionnaire expliquant le type et la date de prélèvement recueilli, le service, l'âge et sexe de patient, le séjour d'hospitalisation, l'antibiothérapie, etc.
- Isolement, purification et identification des bacilles à Gram négatif issus de divers prélèvements recueillis de différents services.
- Etude de la sensibilité des souches envers différentes classes d'antibiotique.
- Détection et détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques par des méthodes phénotypiques (microbiologiques) et génotypiques (moléculaires).

### IV.2. Méthodes de détection des $\beta$ -lactamases

La détection des bactéries productrices de BLSE au laboratoire de microbiologie clinique est une nécessité absolue à la base d'un traitement approprié des patients, d'un contrôle et d'une prévention appropriés de ces infections et d'un suivi de ces souches multirésistantes au niveau des systèmes de surveillance. L'expression phénotypique des BLSE

reste dans la majorité des cas, une base de départ rapide de leur identification. Cependant, seule l'approche moléculaire permettra une réelle individualisation (Elhani, 2012).

Il est donc nécessaire d'avoir différentes approches et des méthodes adéquates qui permettent d'accroître la détection des souches productrices des BLSE. Elles sont divisées en deux catégories : les techniques microbiologiques (phénotypique) et les techniques moléculaires (génotypique) (Gangoue, 2007).

La stratégie de dépistage la plus courante pour la détection des BLSE est fondée sur les recommandations de la CA-SFM française, la CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) américaine et la HPA (Health Protection Agency) britannique (British Society for Antimicrobial Chemotherapy). La réalisation de test de confirmation doit être effectuée lors d'observation de sensibilité diminuée vis-à-vis d'une série de céphalosporine (Rodriguez et Struelens, 2006).

#### IV.2.1. Techniques microbiologiques (phénotypiques)

Les techniques microbiologiques sont fondées sur l'utilisation en combinaison des C3G en présence des inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases tel l'acide clavulanique. Le principe est que le clavulanate inhibe les BLSE et réduit le niveau de la résistance aux céphalosporines (Gangoue, 2007). Plusieurs tests ont été décrits, le plus utilisé et le plus recommandé en microbiologie clinique est le test de double synergie (Elhani, 2012).

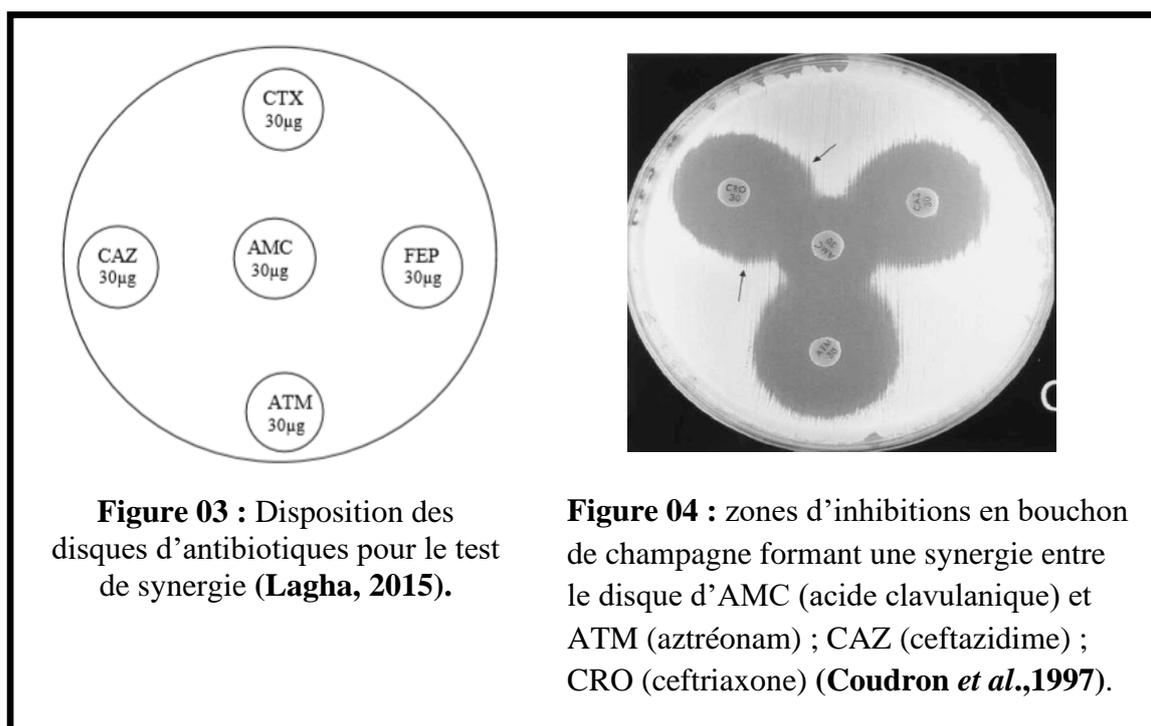
##### IV.2.1.1. Test de synergie (DD test)

Le test de synergie a pour but de détecter la production d'une BLSE chez une souche donnée par l'épreuve de synergie (Jarlier *et al.*, 1988), ce test est réalisé dans des conditions standards de l'antibiogramme, sur gélose Mueller-Hinton (Wiegand *et al.*, 2007; Lagha, 2015; Ayad, 2017), il consiste à déposer les disques de C3G (Céfotaxime, Ceftazidime et Céfepime) 30  $\mu$ g pour chacun et/ou l'aztréonam (30 $\mu$ g) et un disque contenant un inhibiteur de BLSE tel l'Amoxicilline + acide clavulanique (disque d'Augmentin® ou de Claventin®) à une distance de 30 mm centre à centre. Incuber pendant 18 heures à 37°C (Ho *et al.*, 1998; Bradford, 2001; Elhani, 2012).

Pour la lecture, la production d'une BLSE se traduit par l'image de synergie et l'apparition des zones d'inhibition de forme caractéristique appelée « bouchon de champagne » ou « trou de serrure » ou « image fantôme » entre les C3G ou l'aztréonam et l'acide clavulanique et le résultat est interprété comme une preuve présomptive pour la présence d'un BLSE (Coudron *et al.*, 1997; Drieux *et al.*, 2008; Garrec *et al.*, 2011; Lagha, 2015; Ayad, 2017).

Le test de synergie peut être insensible pour plusieurs raisons :

- La distance entre les disques ; dans ce cas, le niveau de résistance est bas et les images de synergie sont plus discrètes. Il faudrait alors rapprocher les disques pour observer une synergie et augmenter la sensibilité de ce test (Gangoue, 2007; Boutal, 2017).
- L'inaptitude des inhibiteurs à inhiber toutes les  $\beta$ -lactamases (Gangoue, 2007).
- L'inaptitude du test de détecter la présence des BLSE (montrer l'image de synergie chez les souches productrices des céphalosporinases chromosomiques) (Gangoue, 2007).



#### IV.2.1.2. Test de synergie sur gélose MH additionnée de la cloxacilline

Ce test est réalisé lors de l'absence d'une image de synergie. Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinases, la présence d'une BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique (Gharout-Sait, 2016), dans ce cas il est recommandé de faire le test sur gélose MH additionnée de la Cloxacilline (250  $\mu$ g/ml), l'inhibiteur de céphalosporinase (Drieux *et al.*, 2008; Garrec *et al.*, 2011). La sensibilité des souches est testée vis-à-vis la céfoxitine, la ceftazidime et du céfotaxime (Ayad, 2017). La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans Cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE. Lorsque les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont  $\geq 5$ mm, la souche est dite hyperproductrice de céphalosporinase (Drieux *et al.*, 2008).

### IV.2.1.3. Test du double disque ou disque combiné

Appelé aussi test espagnol, ce test est fait pour déterminer s'il y a production d'une BLSE (Lagha, 2015), il consiste à mesurer la zone d'inhibition autour d'un disque de céphalosporine seule et le diamètre d'un disque de la même céphalosporine additionné d'acide clavulanique (Boutal, 2017). Pour la technique, déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (ceftazidime, céfotaxime ou ceftriaxone) et ou d'aztréonam à une distance de 25 à 30 mm (centre à centre), puis laisse diffuser les antibiotiques à la température ambiante du laboratoire (sur la paillasse) pendant une heure. Remplacer le disque d'AMC par un disque de CTX et incubé à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18 h à 24 h (Ho *et al.*, 1998).

Le test est considéré comme positif et la présence de BLSE est indiquée si le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après la diffusion du disque de l'AMC est  $\geq 5\text{mm}$  par rapport au celle du disque de C3G seule (Garrec *et al.*, 2011; Lagha, 2015).

Cette méthode est recommandée par le CLSI en raison de sa simplicité d'exécution et d'interprétation des résultats de même qu'une meilleure performance de sensibilité (92.9%) et de spécificité (96.6%) par rapport aux autres tests phénotypiques (Vallée, 2015).

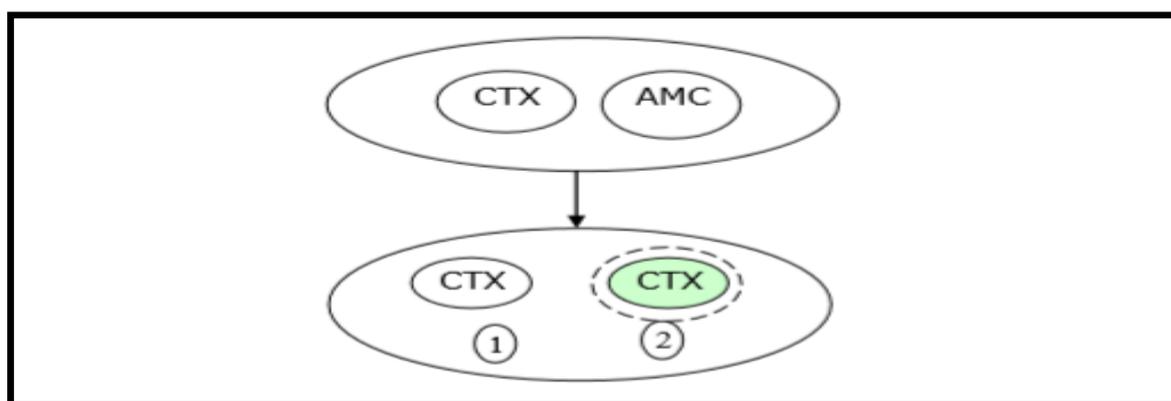


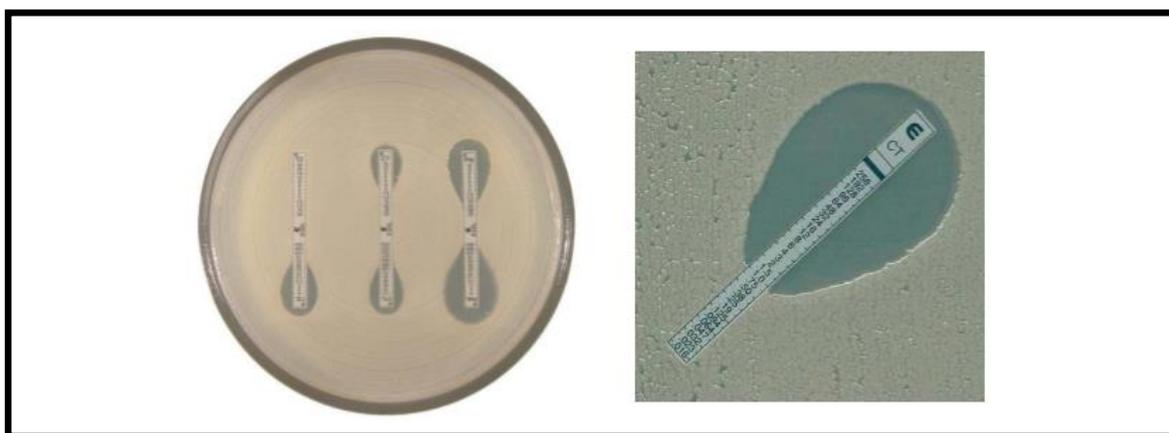
Figure 05 : schéma de détection des BLSE par le test de double disque (Lagha, 2015).

### IV.2.1.4. Les bandelettes E-test

Les bandelettes E-test ont été développées afin de quantifier la synergie entre les céphalosporines à spectre étendu et le clavulanate. Ces bandelettes bilatérales, de matière plastique sont imprégnées d'antibiotique selon un gradient exponentiel de concentration (en  $\mu\text{g/ml}$ ), sont nommées CT/CTL, TZ/TZL et PM/PML car elles renferment sur un bout un gradient de céfotaxime (CT), ou de ceftazidime (TZ), ou de céfépime (PM) et de l'autre bout un gradient de la même molécule associée à l'acide clavulanique (4 mg/L), ce qui permet d'obtenir la valeur de la CMI d'un antibiotique pour une souche bactérienne donnée (Drieux *et al.*, 2008; Elhani, 2012).

L'application de ces bandelettes se fait sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à tester. Après incubation, une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  (**Gharout-Sait, 2016**). Cette déformation elliptique ou la présence d'une zone fantôme indique la production de BLSE (**Drieux et al., 2008**). Le rapport entre la CMI de la céphalosporine seule/CMI avec l'acide clavulanique doit être  $\geq 8$  Pour confirmer la présence d'une BLSE (**Boutal, 2017**).

Dans cette méthode, la zone d'inhibition est lue à partir de deux moitiés de la bandelette. Une diminution de la CMI de la ceftazidime de plus de trois dilutions en présence de clavulanate est interprétée comme un test positif indiquant une éventuelle BLSE. Ce test est très cher, de réalisation facile, mais parfois en raison de la faible production d'enzymes, des résultats indéterminés peuvent être obtenus. Il arrive aussi que l'acide clavulanique diffuse du côté où la ceftazidime est seule, ce qui rend la lecture difficile (**Gupta, 2007**).



**Figure 06 :** Bandelettes E test® BLSE (**Vallée, 2015**).

#### IV.2.1.5. Test tridimensionnel

Le test tridimensionnel décrit par Thomson et Sanders, est une modification de la procédure de diffusion du disque. Il comprend une étape supplémentaire consistant à appliquer un inoculum bactérien standardisé dans une fente circulaire de la gélose à 3 mm du disque antibiotique vers le centre de la plaque. La distorsion ou la discontinuité dans la zone circulaire d'inhibition attendue est considérée comme un test positif. Cependant, le remplissage de la fente de manière homogène et sans débordement sur la surface de la gélose peut être difficile et fastidieux. Le test n'a pas été affiné au point de pouvoir être adopté pour une utilisation de routine dans le laboratoire de microbiologie clinique (**Bradford, 2001**).

Ce test permet non seulement d'avoir les informations sur les profils de substrat des  $\beta$ -lactamases, mais aussi sur la sensibilité de la souche vis -à- vis des antibiotiques utilisés

(Gangoue, 2007). C'est une méthode très sensible, mais techniquement difficile et exigeante en main-d'œuvre nécessitant un microbiologiste clinique expérimenté pour interpréter le résultat (Gupta, 2007).

#### IV.2.1.6. Cica-Beta-Test

Le Cica-Beta-Test est une méthode techniquement simple et rapide (15 min maximum) pour détecter les BLSE, mais aussi les AmpC surexprimées et les métallob-lactamases (Garrec *et al.*, 2011) à partir d'une culture bactérienne de 24 h. Il utilise 4 bandelettes : une bandelette de contrôle sans inhibiteur pour détecter l'hydrolyse des céphalosporines à spectre étendu, une deuxième contenant l'acide clavulanique pour la détection des BLSE, une troisième contenant l'acide boronique pour détection des enzymes de type AmpC et une quatrième contenant l'EDTA pour la détection des métallob-lactamases (Garrec *et al.*, 2011; Elhani, 2012).

Ce test est basé sur l'utilisation d'une céphalosporine chromogène, possédant un groupement protecteur prévenant dans la rupture de cycle  $\beta$ -lactame. Néanmoins, cette céphalosporine est hydrolysée par les BLSE, les enzymes de type AmpC et les métallob-lactamases donnent un changement de coloration du jaune en rouge après 2 à 15 min à température ambiante. Si la bactérie possède une BLSE, seule la bandelette concernée doit rester jaune puisque l'acide clavulanique l'aura neutralisée. Par contre, si toutes les bandelettes virent au rouge, il est alors impossible de préciser la nature de la multirésistance par ce simple test. La sensibilité de cette technique a été estimée à 85 % pour la détection des BLSE (Elhani, 2012).

#### IV.2.1.7. Les disques BBL Sensi-Disk (BD Biosciences, Sparks, Md.)

Ce test de confirmation utilise la méthode de diffusion avec les disques de cefotaxime et de ceftazidime seuls et contenant de l'acide clavulanique. Quand le diamètre d'inhibition de la combinaison céphalosporine/acide clavulanique est supérieur d'au moins 5 mm à celui de la céphalosporine seule, indique une éventuelle BLSE (Gangoue, 2007).

#### IV.2.1.8. Méthodes automatisées

Les automates permettent d'identifier les BLSE tel le Vitek 2 de Biomérieux®. Ces systèmes sont basés sur la mesure de l'activité antibactérienne des céphalosporines à large spectre seule et en présence d'acide clavulanique en termes de CMI (Elhani, 2012).

La carte Vitek pour la détection des BLSE, utilise la ceftazidime ou le cefotaxime seul (0,5 $\mu$ g/ml) en combinaison avec l'acide clavulanique (4 $\mu$ g/ml). La réduction prédéterminée de la croissance microbienne dans les puits contenant l'acide clavulanique par rapport à ceux contenant les céphalosporines seules indique la présence de BLSE. La sensibilité et la

spécificité de ce test sont supérieures à 90%, Le coût de l'équipement est très élevé (Gangoue, 2007; Gupta, 2007).

D'autres systèmes automatisés comme Dade Behring MicroScan (Sacramento, Calif.) et le système microbiologique automatisé BD Phoenix de Becton Dickinson Biosciences (Sparks, Md) sont aussi capables de détecter les BLSE, leur sensibilité variait de 96% (BBL sensi-Disk) à 100% (MicroScan) et leur spécificité de 94% (E-test) à 100% (BBL sensi-Disk) (Gangoue, 2007).

#### IV.2.1.9. Méthodes de détection des carbapénèmases

La détection des bactéries productrices de carbapénèmases reste un problème d'importance majeure pour le choix d'un schéma thérapeutique approprié, cette détection reste difficile, car elle ne peut pas être basée sur le profil de résistance seulement. En effet, les CMI vis-à-vis des carbapénèmes des souches productrices de carbapénèmases sont très variables et peuvent rester dans la zone de sensibilité selon la CA-SFM, de l'EUCAST et du CLSI (Grall *et al.*, 2011).

Pour les BGN non fermentaires, la production de carbapénèmases soit recherchée chez les souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes (imipénème et/ou méropénème) soit résistants à la ticarcilline, soit à la ceftazidime. Par contre chez les entérobactéries, en se basant sur les critères de l'EUCAST, l'ertapénème, dont les valeurs seuils sont les plus basses, semble être le marqueur le plus sensible pour détecter les carbapénèmases (Grall *et al.*, 2011).

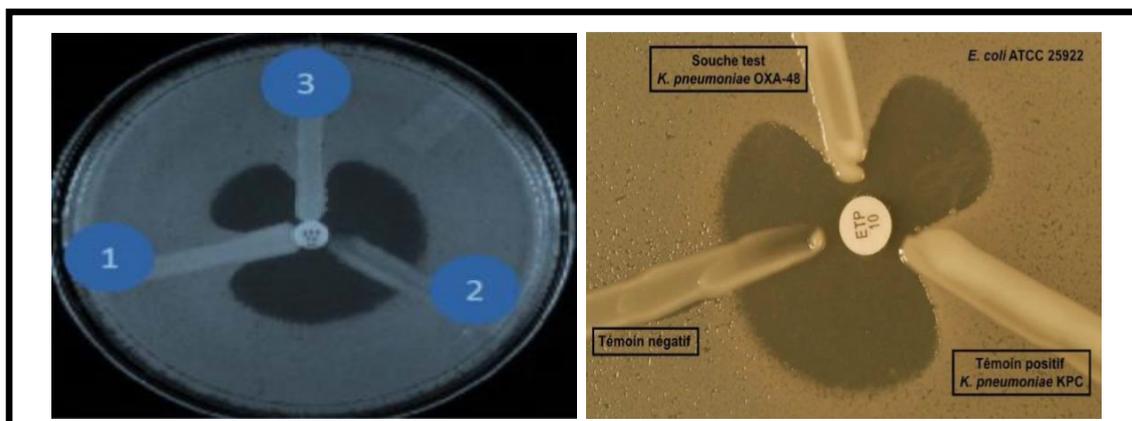
Il existe différents tests phénotypiques qui servent la détection des carbapénèmases, ils sont basés sur l'inhibition de la croissance bactérienne par le tazobactam, l'acide clavulanique ou l'acide boronique pour détecter la production de carbapénèmases de classe A (KPC), l'inhibition par l'EDTA pour la détection de l'activité des MBLs (IMP, NDM et VIM) et du NaCl pour les types OXA-48 (Vallée, 2015).

##### IV.2.1.9.1. Test de Hodge modifié

Le test de Hodge modifié est la seule méthode recommandée actuellement par le CLSI, permet de mettre en évidence la production d'une carbapénémase pour les souches qui présentent un profil de résistance à l'imipénème (Medboua, 2011; Rachidi, 2013).

Ce test consiste à ensemencer par écouvillonnage en culture confluyente une suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland de la souche sensible (eg. *E. coli* ATCC 25922) sur une gélose MH, puis déposer un disque de carbapénème (méropénème, ertapénème ou imipénème) à 10  $\mu$ g au centre de la boîte. Les souches test suspectées de produire une carbapénémase et les souches témoins sont ensemencées en strie depuis le disque vers la périphérie de la boîte, puis incubé pendant 18 h à 37°C. La présence d'une déformation de la zone d'inhibition autour du

disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif en profil dit « cloverleaf-like » indiquant la production d'une carbapénémase qui hydrolyse l'imipénème par la souche testée (Rachidi, 2013; Boutal, 2017).



**Figure 07 :** Test de Hodge modifié pour la détection des carbapénémases (Rachidi, 2013; Vallée, 2015).

#### IV.2.1.9.2. Test d'inhibition

Les tests d'inhibition sont basés sur les caractéristiques propres de chaque classe d'enzyme ainsi sur la synergie entre les inhibiteurs de carbapénémases comme l'EDTA et un carbapénème (méro-pénème ou imipénème). Ce test peut être réalisé à partir de disques (test de synergie sur doubles disques ou test de disque combiné) ou en utilisant les bandelettes E-test MBL (Biomérieux) commercialisées (Rachidi, 2013).

Les inhibiteurs utilisés sont :

- ✓ L'EDTA ou acide dipicolinique pour les enzymes de classe B (métallo- $\beta$ -lactamases).
- ✓ L'acide boronique pour les enzymes KPC de classe A.

Selon les recommandations des groupes d'experts de l'EUCAST et de l'EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) (Grall et al., 2011):

##### ➤ Test de disque combiné pour la détection des MBL

La détection des enzymes de classe B (MBL) chez les entérobactéries doit être basée sur le test de disque combiné méropénème et méropénème plus EDTA (0,25 M). L'augmentation de la zone d'inhibition de 5 mm ou plus indique que le test est positif (Grall et al., 2011; Rachidi, 2013).

##### ➤ Test de synergie sur doubles disques pour la détection des enzymes de KPC

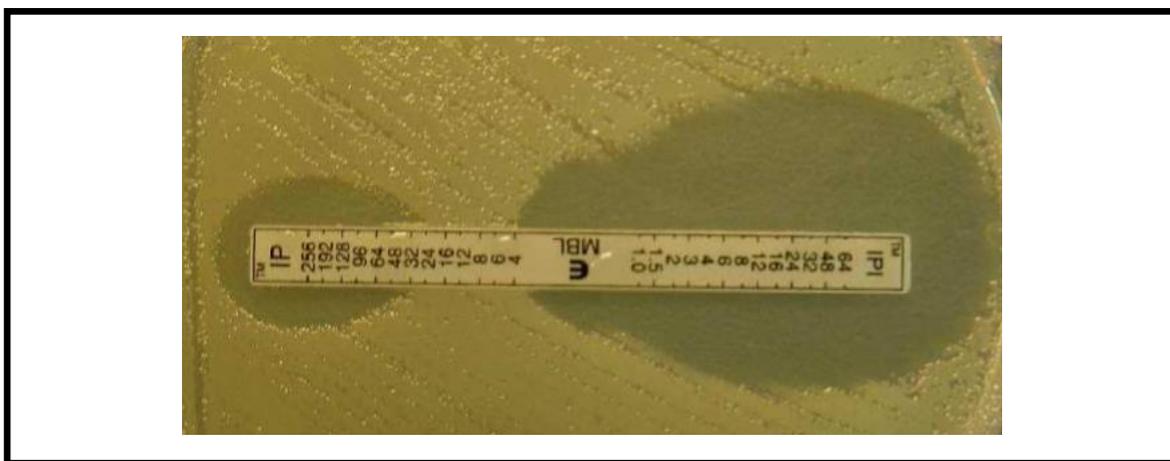
La détection de souches productrices de KPC ou autres carbapénémases de classe A est basée sur l'effet inhibiteur de l'acide boronique. Le mécanisme d'inhibition n'est pas encore connu, mais il semble que les méthodes basées sur l'acide boronique montrent une très

bonne sensibilité dans la détection des producteurs de KPC. (Coudron, 2005; Grall *et al.*, 2011).

#### IV.2.1.9.3. Les bandelettes E-test MBL

Ce test repose sur la diminution de la CMI de ces molécules en présence d'inhibiteurs spécifiques de  $\beta$ -lactamases (Rachidi, 2013).

Les bandelettes E-test MBL permettent la détection des métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) par combinaison de l'imipénème et l'EDTA. D'autres bandelettes existent sert à la combinaison entre le méropénème et l'EDTA ou l'acide boronique. Une diminution triple-ou-supérieure à la CMI imipénème en présence d'EDTA indique un résultat positif (Rachidi, 2013).



**Figure 08:** E-test MBL (Imipenem vs Imipenem/EDTA) (Rachidi, 2013).

#### IV.2.1.9.4. Milieux chromogènes

Trois milieux ont été commercialisés afin de permettre une détection simple et rapide des carbapénèmases, spécialement celle des EPC, notamment dans le cadre de prélèvements de dépistage (Rachidi, 2013).

Des milieux de culture contenant une C3G, sert à détecter les bactéries productrices de BLSE comme exemple les milieux ChromID ESBL®, Biomérieux, peuvent détecter les carbapénèmases de classe A et B, mais en aucun cas les carbapénèmases de classe D dont la sensibilité aux C3G est conservée, sauf en cas d'association à une BLSE ou à une céphalosporinase. Il détecte les bactéries résistantes aux carbapénèmes qui présentent une forte résistance aux carbapénèmes, mais il ne détecte pas les producteurs de carbapénèmases présentant un faible niveau de résistance aux carbapénèmes, comme plusieurs MBL ou OXA-48 producteurs (Rachidi, 2013).

Le deuxième milieu contient une classe des carbapénèmes (test Brilliance CRE®, Thermo Fisher scientifique, Royaume-Uni / test chromID® CARBA agar bioMérieux).

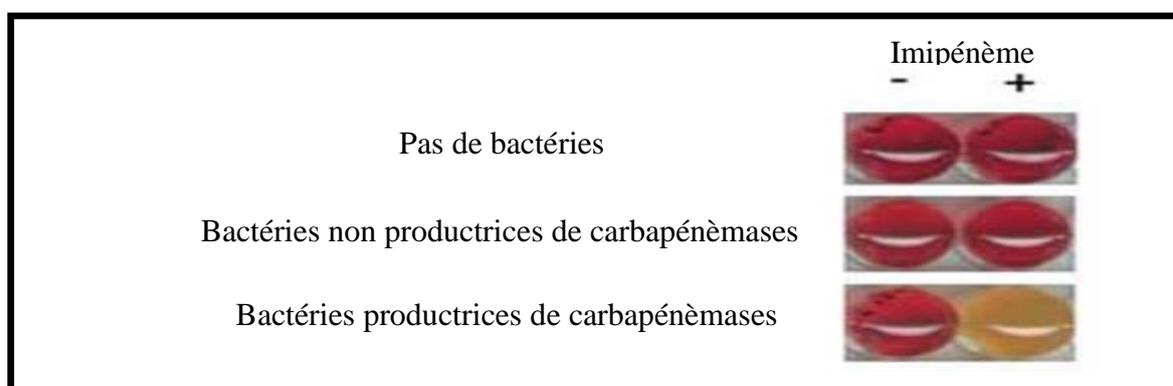
Permet la détection des producteurs KPC et MBL, mais pas tous les producteurs d'OXA-48 (Rachidi, 2013).

Enfin, l'un des supports de dépistage les plus récemment développés (SUPERCARBA) contient la cloxacilline, le zinc et l'ertapénème. Il montre une excellente sensibilité et spécificité pour la détection de tout type de producteur des carbapénèmes et pas seulement les isolats résistants de haut niveau aux carbapénèmes. En comparaison avec les deux autres, il montre une meilleure sensibilité et spécificité pour la détection de tous les types de producteurs carbapénèmes y compris l'OXA-48 lorsqu'ils sont présents en faibles quantités dans les selles (Rachidi, 2013).

#### IV.2.1.9.5. Test RAPIDEC® CARBA NP ou Carba NP test

Carba NP test est une nouvelle technique biochimique permet une détection rapide de la production des carbapénèmes par l'hydrolyse de l'imipénème en surveillant le changement de couleur d'un indicateur de pH (mise en évidence d'une acidification du milieu). Ce test a été largement validé pour trois types de bactéries, permettant une détection fiable des producteurs de carbapénèmes connues chez les *Entérobactéries*, *Pseudomonas spp.* et *Acinetobacter ssp.* (Dortet et al., 2015; Poirel et Nordmann, 2015).

Lorsque ce test biochimique est utilisé, la couleur des puits viré du rouge à l'orange ou jaune pour toute souches testées qui produisent des carbapénèmes, alors que les puits correspondant à des extraits bactériens qui ne produisent pas de carbapénèmes resté rouge, quelque soit leur niveau de sensibilité aux carbapénèmes. Le changement de couleur débute dès 5 à 10 minutes après l'incubation en fonction de la famille de carbapénémase impliquée, 2 à 30 minutes pour KPC, 30 minutes à 1 heure pour OXA-48 et 15 minutes à 1 heures pour NDM. C'est une méthode peu couteuse et facile à réaliser avec une bonne sensibilité et spécificité envers toutes les carbapénèmes (Rachidi, 2013; Boutal, 2017).



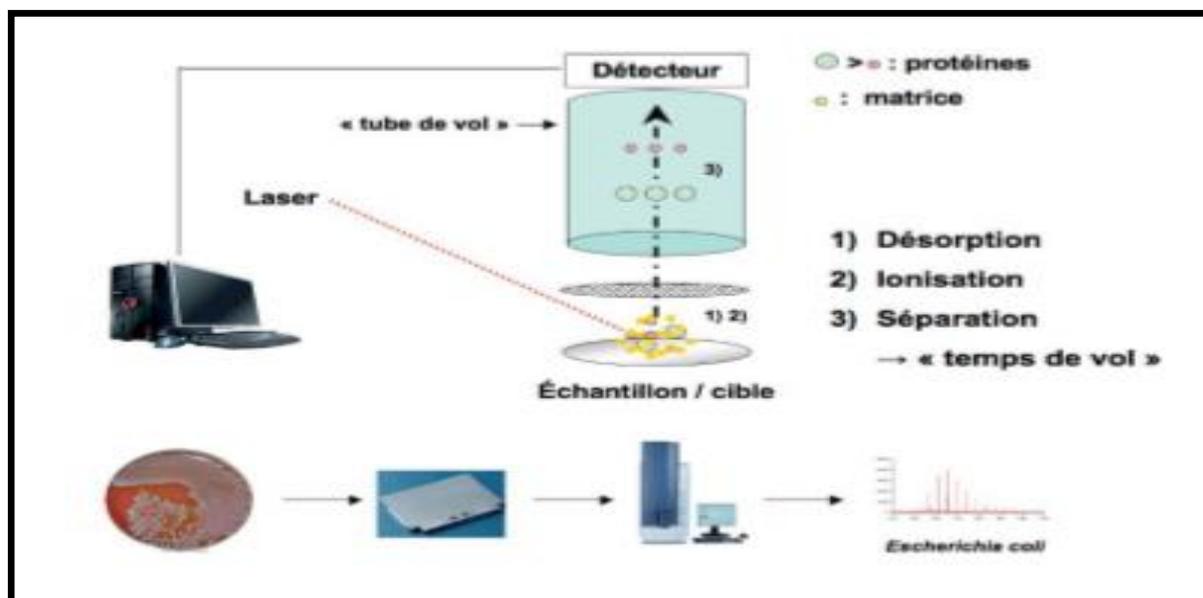
**Figure 09 :** Carba NP test, l'indicateur du pH vire du rouge au jaune/orange lors de la présence d'une carbapénémase (Rachidi, 2013).

#### IV.2.1.9.6. Technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF

La technique MALDI-TOF est l'abréviation de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of Flight (**Carbonnelle et Nassif, 2011**). Cette application innovante consiste à visualiser une activité enzymatique bactérienne à partir du spectre d'une solution d'antibiotique (carbapénème) analysé avant et après incubation avec une souche bactérienne (**Riethmuller, 2013**).

Le principe de cette technologie est de transformer des molécules présentes dans l'échantillon de leur état naturel en ions en phase gazeuse et obtenir leur masse moléculaire en analysant le rapport masse/charge ( $m/z$ ) (**Descy et al., 2010**).

La technique consiste à incuber de 20 minutes à 2 heures une solution de carbapénème avec la souche à tester. Après centrifugation, le surnageant est analysé en spectrométrie de masse pour mettre en évidence la disparition du pic correspondant à l'antibiotique utilisé et l'apparition de nouveaux pics, due à des produits de son hydrolyse (**Riethmuller, 2013; Boutal, 2017**). Cette technique nécessite le développement et la validation d'un protocole spécifique, une mise au point fine, des étapes de centrifugation supplémentaires, un spectromètre de masse MALDI-TOF et du personnel particulièrement formé et entraîné (**Dortet et al., 2013; Dortet et al., 2014**).



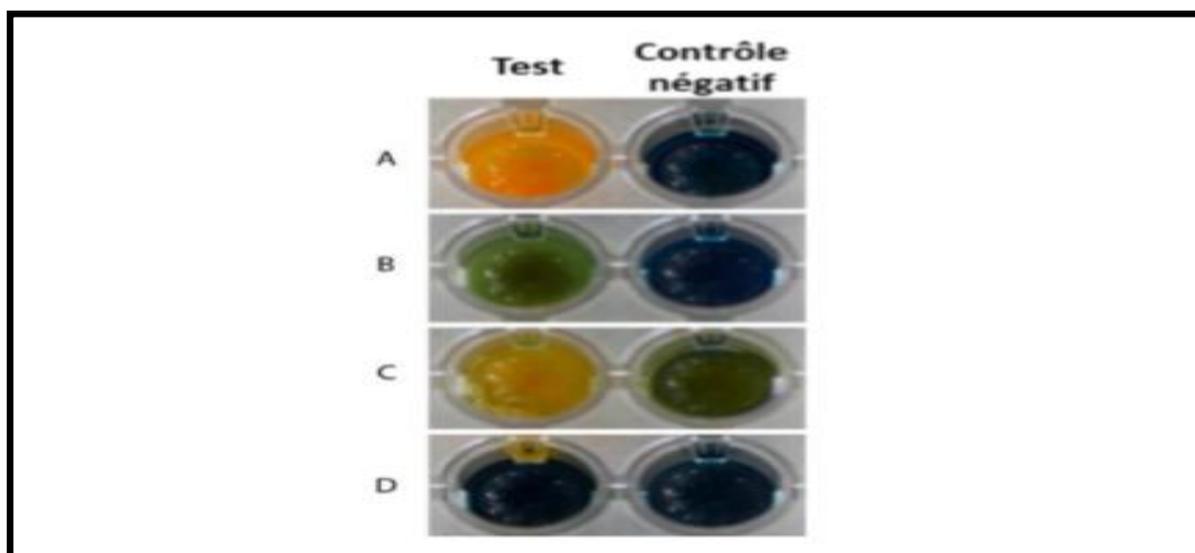
**Figure 10** : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (**Courcola, 2009**).

Les applications de cette technologie sont très vastes. En microbiologie elle est utilisée pour la confirmation et l'identification des bactéries et les agents pathogènes (**Pavlovic et al., 2013**) obtenus à partir de milieux de culture ou des échantillons biologiques ainsi des

prélèvements clinique, étude de la sensibilité aux agents anti-infectieux, détection de la résistance aux antibiotiques, détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique, l'analyse des protéines bactériennes responsable de la résistance, caractériser les enzymes ou les produits de dégradation dus au mécanismes de résistance aux antibiotiques (Suarez, 2013).

#### IV.2.1.9.7. Test Blue Carba®

Le test Blue Carba permet aussi de mettre en évidence le changement de pH du milieu réactionnel en utilisant le bleu de bromothymol comme indicateur coloré ainsi la mise en évidence de l'hydrolyse de l'imipénème. Pour la technique, il suffit d'inoculer le milieu (avec ou sans imipénème) avec une colonie, la réaction est réalisée dans des plaques de micro-titration incubées à 37°C sous agitation pendant 2 heures. Ce test a montré une sensibilité et spécificité de 100% pour la détection des MBL, KPC et Oxa-48 (Boutal, 2017).



**Figure 11** : Résultats d'un test blue Carba (A, B, C : Résultats positifs, D : résultat négatif) (Boutal, 2017).

### IV.3. Techniques moléculaires (génotypique)

Les tests phénotypiques permettent de manière présomptive d'identifier la présence de BLSE, mais peut se heurter à des difficultés. Seules les méthodes moléculaires qui permettent à l'heure actuelle la confirmation, l'identification et la caractérisation de façon précise des BLSE produits par les souches, elles détectent les gènes codant pour les BLSE y compris celles à bas niveau de résistance qui peuvent passer inaperçues par les méthodes phénotypiques. Ces techniques sont même capables de détecter les gènes de résistance directement à partir des prélèvements biologiques sans passer par la culture bactérienne,

permettant un gain de temps crucial pour le traitement des patients (**Gangoue, 2007; Elhani, 2012; Foulal, 2013**).

Les méthodes de détection moléculaire suivantes peuvent être appliquées : l'utilisation des sondes d'ADN spécifiques, la PCR avec plusieurs variantes, l'oligotypage, la « Ligase Chain Reaction », le séquençage des nucléotides, l'hybridation sur puces à ADN, PCR-ligase de l'ADN sur microarray, etc (**Gupta, 2007; Gangoue, 2007; Rachidi, 2013**).

#### **IV.3.1. Sondes d'ADN**

Une des premières techniques de détection des BLSE, basée sur la recherche de séquences complémentaires en utilisant des sondes d'ADN spécifiques des gènes TEM et SHV. Depuis la description de cette technique, de nombreux variants de TEM et SHV ont été cités, ce qui multiplie le nombre de sondes à mettre en œuvre. De plus, il semblerait que la méthode ne permette pas toujours de faire la différence entre les BLSE et les entérobactéries non productrices de BLSE et qu'il existe des difficultés à distinguer les variants de TEM et SHV (**Foulal, 2013**).

#### **IV.3.2. Oligotyping**

La technique d'oligotyping décrite par **Ouellette et al** à la fin des années 1980 pour la détection des  $\beta$ -lactamases. Elle sert à détecter les types TEM-1 et SHV-2. Cette méthode utilise des sondes oligonucléotidiques conçues pour détecter des mutations ponctuelles dans des conditions d'hybridation rigoureuses (**Ouellette et al., 1989; Bradford, 2001**).

Quelques années plus tard, Mabilat et Courvalin ont développé d'autres sondes oligonucléotidiques qui peuvent être marquées avec un radioisotope, ou avec des nucléotides biotinylés (marquées avec la biotine). Les auteurs cités ont aussi pu étendre la méthode à la détection de 6 autres variants du gène *bla*<sub>TEM</sub>. En utilisant cette méthode, plusieurs nouvelles variantes de TEM ont été identifiées dans un ensemble d'isolats cliniques (**Mabilat et Courvalin, 1990; Bradford, 2001; Foulal, 2013**). Cependant, étant donné le nombre de variants de TEM existant à l'heure actuelle, cette technique semble relativement lourde à mettre en œuvre du fait de la nécessité d'une sonde spécifique de chaque type d'enzyme. Cette technique permet d'obtenir un résultat en 48 h (**Foulal, 2013**).

#### **IV.3.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR est l'une des méthodes moléculaires les plus sensibles et faciles à réaliser, permet l'amplification génique *in vitro*, pour obtenir un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN spécifique présente dans un échantillon même en très faible quantité (**Foulal, 2013; Ayad, 2017**).

Cette technique basée sur l'amplification de chaque famille d'enzymes en utilisant des couples d'amorces spécifique, complémentaires avec des régions conservées des gènes de résistance et qui sont choisis après l'analyse du génome de façon à s'hybrider dans des régions où l'on ne sait pas que diverses mutations ponctuelles se produisent (**Courvalin, 1991; Bradford, 2001**). Elle a été utilisée pour la recherche des gènes codant les  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> de groupe 1, *bla*<sub>CTX-M</sub> de groupe 9, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> et *bla*<sub>DHA-1</sub>), des gènes codant la résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*), aux quinolones (*aac6'-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*), à la colistine (*mcr-1*) (pdf 51), ainsi les gènes codant pour la famille des OXA  $\beta$ -lactamases (**Steward et al., 2001**).

Cependant ce type de méthode pose un problème si elle n'est pas associée à une analyse complémentaire car elle ne permet pas de faire la distinction entre les différents variants de TEM et SHV ainsi la distinction entre les enzymes responsable d'un phénotype BLSE ou non-BLSE. Il est donc intéressant de coupler l'amplification génique à certaines techniques telles le séquençage, RFLP et SSCP (**Foulal, 2013**).

#### IV.3.4. PCR-SSCP

La SSCP ou Single Strand Conformational Polymorphism est une méthode permettant la détection de polymorphismes génétiques par différence des profils de migration de fragments préalablement amplifiés (**Foulal, 2013**).

Cette technique a été développée avec succès pour caractériser les  $\beta$ -lactamases de la famille TEM. C'est une méthode simple et rapide pour la détection de mutations connues qui modifient les sites de reconnaissance des endonucléases de restriction au sein du gène *bla*<sub>TEM</sub>, et également utilisée pour cribler les BLSE-SHV. Elle est particulièrement intéressante pour effectuer un screening relativement rapide (24 h de plus par rapport à une PCR), en particulier d'éventuels mutants de SHV, mais ne peut en aucun cas apporter des informations sur le type de BLSE. De plus, le choix du fragment amplifié peut être un facteur limitant car, comme le montrent Chanawong *et al.*, cette technique ne permet pas de distinguer SHV-1, -3, -2a et -11 dans les conditions choisies par les auteurs (**Chanawong et al., 2000**).

Récemment, une analyse PCR-polymorphisme conformationnel simple brin (PCR-SSCP) a été développée pour caractériser les  $\beta$ -lactamases de la famille SHV. Cette technique s'est avérée utile pour typer des variants SHV connus, jusqu'à et y compris le gène codant SHV-7 (**Chanawong et al., 2000**).

#### IV.3.5. PCR-RFLP

Une autre approche réside dans l'utilisation d'enzymes de restriction après amplification génique des séquences, rapide et simple, directement applicable à partir des

isolats cliniques (Arlet *et al.*, 1995). Les tailles des fragments générés par chaque enzyme de restriction après leur séparation par l'électrophorèse indiquent des mutations ponctuelles au sein de gène (Bradford, 2001).

Cette technique a été appliquée essentiellement pour la détection des BLSE de la famille TEM au début des années 1990. Les amplifiats utilisés sont digérés par plusieurs enzymes de restriction (*Sau3aI*, *HhaI*, *MseI*) avant d'être soumis à une électrophorèse. De cette façon, Arlet *et al.*, ont détectés la présence de plus de 20 enzymes de la famille TEM ainsi de mettre en évidence TEM-29 (Arlet *et al.*, 1995).

Quelques années plus tard, la méthode a été appliquée pour la détection des mutants de la famille SHV. Encore que cette technique ne puisse déterminer avec précision le type de variant de SHV impliqué, mais elle présente un avantage majeur permettant un screening relativement rapide d'éventuelles BLSE, ainsi d'obtenir un résultat en 48 h après l'isolement (Foulal, 2013).

Cependant, les gènes *bla<sub>SHV-3</sub>*, *bla<sub>SHV-4</sub>*, *bla<sub>SHV-7</sub>* et *bla<sub>SHV-13</sub>* ne peuvent pas être identifiés sans ambiguïté par analyse PCR-RFLP. La PCR d'insertion de sites de restriction (RSI-PCR) a été développée pour la première fois pour détecter des mutations ponctuelles entre des séquences d'ADN étroitement apparentées, ainsi elle est appliquée pour la détection des mutations des gènes *bla<sub>SHV</sub>* qui ne peuvent être identifiés sans ambiguïté par la PCR-RFLP. De plus, la PCR-RFLP peut théoriquement être appliquée pour différencier *bla<sub>SHV-6</sub>*, *bla<sub>SHV-8</sub>*, *bla<sub>SHV-14</sub>*, *bla<sub>SHV-18</sub>* en *bla<sub>SHV-23</sub>* et *bla<sub>SHV-25</sub>* en *bla<sub>SHV-27</sub>*, permettant ainsi à presque toutes les variantes de *bla<sub>SHV</sub>* décrites d'être différenciée facilement et de manière fiable (Chanawong *et al.*, 2001).

De plus, Chanawong *et al.*, ont montré que la combinaison entre les techniques PCR-SSCP et PCR-RFLP, peut détecter jusqu'à 17 variants de SHV. Cependant, SHV-2a ne peut pas être distingué de SHV-2, tout comme SHV-15 de SHV-5 (Chanawong *et al.*, 2000).

#### IV.3.6. PCR en temps réel

Cette technique a été appliquée à la détection des mutants de SHV au début des années 2000 par Randegger et Hachler qui utilise des sondes d'hybridation oligonucléotidiques marquées, fluorescentes par un fluorophore spéciales (Randegger et Hachler, 2001), permettant l'analyse des courbes de fusion des amplifiats en temps réel sur un instrument Light Cycler (Dubouix et Marty, 2004). Les auteurs cités précédemment ont démontrés que c'est une méthode rapide, sensible et spécifique pour la détection de mutations dans les trois codons cruciaux aux positions 179, 238 et 240 de la réaction génique du *bla<sub>SHV</sub>* au cours d'une seule et même réaction (Randegger et Hachler, 2001). En commençant par la

croissance bactérienne brute sur des milieux d'isolement primaires, cette méthode permet de conclure en moins d'une heure si une souche héberge un BLSE SHV et le cas échéant, le sous-groupe phénotypique auquel elle appartient (**Dubouix et Marty, 2004**).

Pour le moment, elle ne s'adresse qu'à la détection des mutants SHV mais pourra être adaptée d'une part à la recherche de mutants nouvellement décrits dans cette famille ainsi qu'à la détection des variants TEM nécessitant le design des amorces spécifiques de mutations recherchées (**Foulal, 2013**).

#### IV.3.7. Ligase Chain Reaction (LCR)

La ligase chain reaction est une nouvelle stratégie de différenciation des gènes *bla<sub>SHV</sub>* essentiellement appliquée par Jungmin Kim et Hoan-Jong Lee. Cette technique emploie une ligase assez stable permettant la discrimination des séquences d'ADN différant dans une seule paire de bases, recuire à leurs brins complémentaires à 60 ° C. Ensuite, la ligase thermostable ne lie que les amorces qui sont parfaitement complémentaires de leur séquence cible et s'hybrident directement les unes à côté des autres (**Kim et Lee, 2000**). Un mésappariement d'une seule base dans la jonction oligonucléotidique ne sera pas ligaturé et ensuite amplifié (**Bradford, 2001**).

Etant donné que les produits oligonucléotidiques d'un tour peuvent servir de substrats au cours du tour suivant. Les auteurs cités auparavant ont développé une méthode de typage LCR en utilisant quatre ensembles différents d'amorces LCR biotinylées pour caractériser des mutations ponctuelles dans les gènes des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu dérivées de SHV (BLSE). Avec le typage LCR, ils ont distingué sept gènes SHV codant pour SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV-5 ou SHV-12  $\beta$ -lactamase (**Kim et Lee, 2000**).

#### IV.3.8. Séquençage

Le séquençage reste la technique de choix pour la détection des BLSE. Cette méthode a pour but de détecter concurremment toutes les BLSE en environ 24 h, par comparaison avec les séquences obtenues de bases de données (GENBANK, CLUSTAL W) sans disposer de sondes spécifiques de chaque mutation (**Bradford, 1999**). Effectivement, il est possible que la variabilité de séquence observée pour certains variants SHV soit reliée à la difficulté d'interprétation des autoradiogrammes plutôt qu'à de véritables variations de séquences, phénomène duquel on s'affranchit avec les nouveaux analyseurs (**Dubouix et Marty, 2004**). Bien que cette technique est réservée à des laboratoires équipés d'un appareillage adéquat (**Bradford, 1999**).

### IV.3.9. Mini-séquençage

La procédure de miniséquençage, ou méthode du premier changement de nucléotide (FNC), s'est précédemment avérée efficace pour la détection de sites de polymorphiques chez l'homme, puis elle a été développée en 2001 par Howard *et al.*, fondé sur le changement du premier nucléotide. La procédure est réalisée dans des micropuits et ne nécessite aucune électrophorèse. Il est donc facile à automatiser, comme il produit des résultats quantitatifs, ne nécessite ni compétence ni subjectivité dans l'interprétation (Howard *et al.*, 2002). Cette méthode a été décrite pour la mise en œuvre de mutations de l'angiotensinogène (Chiang *et al.*, 1997), de l'ADN mitochondrial, etc., Cette procédure se base sur l'hybridation d'une amorce consécutivement après le site susceptible d'être muté et l'identification du nucléotide de la base incorporée. Actuellement, elle n'a été développée que pour la détection des variants SHV (Dubouix et Marty, 2004).

### IV.3.10. Iso-électrofocalisation (IEF)

Le principe de cette technique basé sur la séparation des protéines d'un mélange basée sur la différence de point isoélectrique (pI) qui est un paramètre recherché pour caractériser les  $\beta$ -lactamases (Lagha, 2015), elle est réalisée sur des gels de polyacrylamide contenant des ampholines avec une gamme de pH de 3,5 à 10 a une température de 15°C avec un temps de migration (1h 30min) (Bonnet *et al.*, 2000; Lagha, 2015).

La révélation de migration de  $\beta$ -lactamases se fait par dépôt d'un gel d'iode sur le gel polyacrylamide, au bout d'un certain temps, l'apparition d'éclaircissements et des zones de décoloration au niveau de la migration des extraits. Une lecture des points isoélectriques de  $\beta$ -lactamases des souches analysées se fait en les comparants avec les témoins. Des  $\beta$ -lactamases avec les pIs connues ont été utilisées comme témoins : CTX-M-1 (pI 8.4), CTX-M-14 (pI 7.9), CTX-M-15 (pI 8.6) (Lagha, 2015).

### IV.3.11. Détection des carbapénèmases par méthodes moléculaires

Seules les méthodes moléculaires tels PCR (simple et multiplexe), séquençage, hybridation sur puces à ADN ou focalisation isoélectrique permettent à l'heure actuelle, de détecter et de caractériser d'une manière précise les enzymes produites ou les gènes codant pour les carbapénèmase. Les gènes qui sont le plus fréquemment ciblés codent pour les  $\beta$ -lactamases de types KPC, IMP, NDM, OXA-48 et VIM (Grall *et al.*, 2011; Rachidi, 2013; Vallée, 2015; Boutal, 2017).

Ces méthodes sont réalisées en routine dans certains laboratoires cliniques spécialisés ou non, pour pallier aux problèmes de la détection phénotypique des micro-organismes producteurs de carbapénèmase. Des kits commerciaux existent et permettent la détection des

gènes codant les carbapénèmases, y compris directement à partir des échantillons cliniques (Grall *et al.*, 2011).

#### IV.3.12. Détection des carbapénèmases avec des tests immuno-chromatographiques

Récemment, Glupczynski *et al.*, ont rapporté le développement d'un test immunochromatographique à flux latéral qui détecte des épitopes spécifiques de carbapénèmases de type KPC et OXA-48 directement à partir de colonies bactériennes en 15 min en utilisant des anticorps monoclonaux (affinité, spécificité) dirigés contre les enzymes responsables des résistances aux antibiotiques (Meunier *et al.*, 2016; Boutal, 2017).

Ces tests ne détectent que ce qui est recherché, permet d'identifier la famille des carbapénèmases. Par contre, ils détectent directement la production de l'enzyme responsable de la résistance. Une des limitations majeures de ces tests est l'apparition de mutants avec modification du site de reconnaissance d'un des anticorps ce qui induira des résultats faussement négatifs (Boutal, 2017).

Ces tests sont présentés sous forme de cassettes qui intègrent une bandelette permettant la détection de l'enzyme recherchée. Pour réaliser ce test les bactéries sont mises en contact avec un tampon d'extraction puis l'extrait est déposé sur la cassette. Les résultats sont généralement obtenus dans un délai de 15 minutes (Boutal, 2017).

Différents tests ont été déjà décrits pour la détection spécifique de l'IMP, KPC, OXA-48 et NDM. Ils ont une spécificité et une sensibilité très élevée (proches de 100 %), considérés comme bons tests de confirmation pour l'identification des EPC (Boutal, 2017).

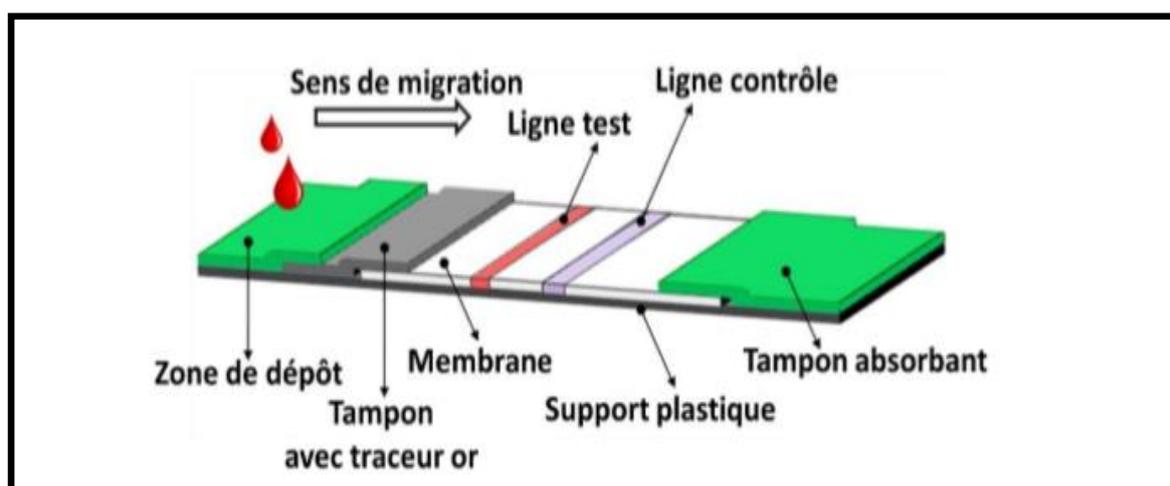
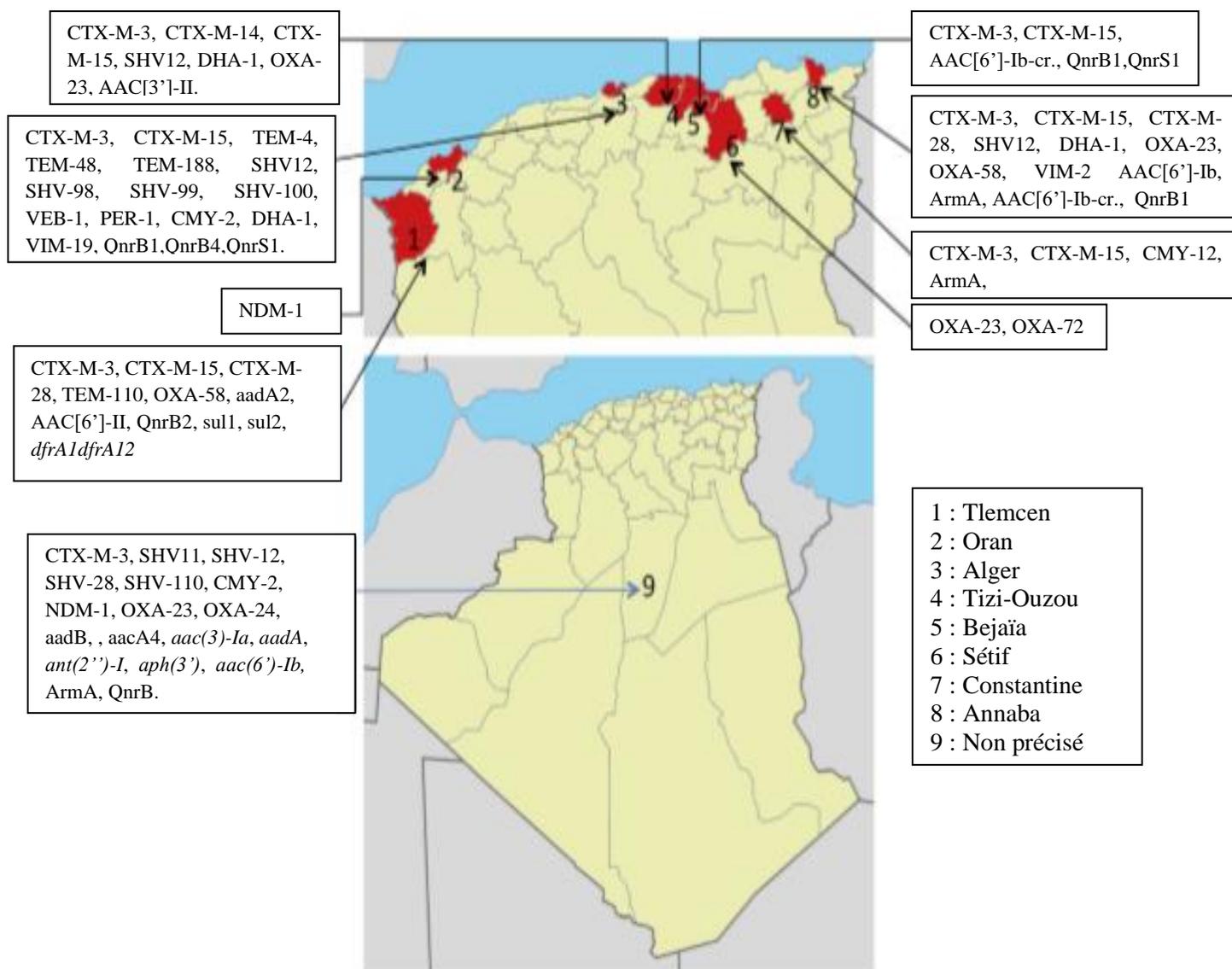


Figure 12 : Principe d'un test immunochromatographique (Boutal, 2017).

IV.3. Epidémiologie du portage des bacilles à Gram négatif résistants aux  $\beta$ -lactamines

**Figure 13 :** Répartition géographique de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Algérie (Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014).

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant dans les pays en voie de développement ou les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays africains. L'Algérie est un pays du nord de l'Afrique où les récentes données de résistance aux antibiotiques indiquent une situation inquiétante. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance notamment dans le nord du pays. Les défis majeurs de cette résistance ont été rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries (Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014).

CMY-2 est le type d'enzyme AmpC le plus répandu et présentant la plus large distribution géographique. Il a été signalé en Algérie. Les AmpC plasmidiques CMY-12 et DHA-1 ont également été identifiés en Algérie (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

Plus de 350 enzymes de type TEM et SHV ont été décrites en se basant sur les différentes substitutions d'acides aminés, plusieurs variants ont été identifiés en Algérie dont TEM-188 et SHV-110 (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

Depuis le début des années 2000, l'émergence et la dissémination des BLSE CTX-M sont observées au niveau mondial. Plus de 130 variants CTX-M ont été décrits et répartis en fonction des similitudes de leurs séquences en acides aminés. En Algérie, deux études ont rapporté que la taille de ces séquences était identique pour les gènes blaCTX-M-3 et blaCTX-M-15 et suggèrent que CTX-M-3 a évolué sous des conditions de pression de sélection antibiotique particulières à ce pays vers CTX-M-15. De nombreuses autres études ont rapporté la présence de ces enzymes aussi bien en milieu hospitalier que communautaire dans le nord de l'Algérie (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

D'autres BLSE ont une distribution moins large que celle du groupe CTX-M ont été identifiées en Algérie, les enzymes VEB-1 chez des souches de *Providencia stuartii* et d'*E. cloacae* et PER-1 chez des souches de *Proteus vulgaris* (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

Ces dernières années, la prescription des carbapénèmes est devenue de plus en plus fréquente dans le cas d'infection documentée à bactérie productrice de BLSE. Les carbapénémases de classe B, essentiellement de type IMP ou VIM, sont également très répandues en Algérie, les variants VIM-2 et VIM-19 ont été respectivement identifiés chez des souches de *P. aeruginosa* et d'entérobactéries. Plus récemment, une nouvelle carbapénémase, New Delhi métallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) a été identifiée. Les premières NDM-1 en Algérie ont été identifiés chez des souches d'*A. baumannii* isolées chez des patients algériens transférés en France et en Belgique. Une autre étude a récemment rapporté la présence de ce gène chez des souches d'*A. baumannii* à l'ouest de l'Algérie (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

La résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est également souvent liée à la production de carbapénémase de classe D (OXA). En Algérie, OXA-58 a été écrite pour la première fois en 2010 à Tlemcen. Depuis, plusieurs études ont rapporté la présence de ces gènes OXA-23, OXA-24, OXA-58 et OXA-72 dans le nord du pays. OXA-23 est la carbapénémase la plus répandue et semble être endémique en Algérie. OXA-48 n'a pas été écrite en Algérie, mais Poirelet *al.* suggèrent que cette enzyme est endémique dans ce

pays, suite aux observations positives effectuées chez les patients transférés de l'Algérie (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les  $\beta$ -lactamines à très large spectre. En Algérie, les gènes *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib* ont été identifiés chez des souches cliniques d'entérobactéries sur des plasmides associés aux gènes codant pour les types CTX-M-3, CTX-M-15 et CTX-M-28 et les gènes *qnrB*. D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés en Algérie comme *aadA2*, *aadB* et *aac4* chez des souches cliniques d'entérobactéries et de *P. aeruginosa*. Dans une autre étude, les gènes *aac(3)-Ia*, *aadA*, *ant(2'')-I*, *aph(3')*, *aac(6')-Ib* ont été identifiés chez des souches d'*A. baumannii* associés aux gènes codant pour les types OXA-23, OXA-24 et NDM-1. Le gène *armA* a été identifié pour la première fois chez des souches d'entérobactéries isolées chez un patient algérien transféré en Belgique. Il a été par la suite identifié chez des souches cliniques de *Salmonella enterica* à Constantine sur des plasmides conjugatifs portant aussi les gènes *bla<sub>TEM-1</sub>* et ceux codant pour les types CTX-M-3 ou CTX-M-15 de même que chez des souches cliniques de *Salmonella non-Typhi* à Annaba associé aux gènes codant pour les types CTX-M-15 et CMY-2 (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

Pour les quinolones, quatre autres déterminants Qnr-like (*qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD*) ainsi que différents variants des protéines QnrA, QnrB et QnrS ont été identifiés chez les entérobactéries. En Algérie, les gènes *qnr* (-A, -B, -S) ont été détectés chez des souches hospitalières d'entérobactéries produisant des BLSE (CTX-M, SHV-12 et VEB-1). Plus récemment, les gènes *qnr* ont été isolés à Bejaia chez des souches d'*E. coli* produisant des BLSE de type CTX-M et responsables d'infections urinaires en milieu communautaire. Le deuxième déterminant PMQR plasmidique découvert est l'enzyme bifonctionnelle AAC[6']-Ib-cr., en Algérie, il a été détecté pour la première fois en 2009 chez une souche d'*E. cloacae*. Depuis, deux autres études ont rapporté la présence de ce gène aussi bien en milieu hospitalier que communautaire (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).

La résistance aux sulfamides est apparue très peu de temps après leur utilisation en clinique, Le premier gène, *sul1*, a été observé, le deuxième gène *sul2* a été récemment trouvé. En Algérie, les allèles *dfrA1* et *dfrA12* ont récemment été identifiés chez des souches d'entérobactéries (**Baba Ahmed-KaziTani et Arlet, 2014**).



*Conclusion et perspectives*



Au terme de ce travail, nous pouvons donc dire que pour mieux répondre au développement des différents types de résistance bactérienne aux ATB, nous nous devons de mieux comprendre les mécanismes catalytiques des enzymes qui sont responsables. Une seule d'une approche multidisciplinaire permet d'atteindre ce but. La résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines a toujours existé, sous tendant la production de diverses  $\beta$ -lactamases, mais la résistance acquise à ces antibiotiques sera une fatalité imprévisible dans une espèce bactérienne et dans un ou plusieurs pays. Il est convenu de mieux connaître par espèce bactérienne et les prévalences de résistance par pays.

L'utilisation des antibiotiques a largement contribué à améliorer la santé publique depuis des années. La famille des  $\beta$ -lactamines a toujours tenu une place de choix dans l'arsenal thérapeutique et prophylactique contre les maladies infectieuses bactériennes dont leur utilisation abusive et excessive, a créé une pression antibiotique à laquelle le génie bactérien a rapidement répondu avec une émergence et extension rapide des résistances acquises permettant la survie bactérienne en présence de l'antibiotique, d'autant plus que la course de vitesse entre le développement de nouvelles molécules d'antibiotiques et l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance, ainsi la diffusion des souches multirésistantes telle que les bacilles à gram négatif productrices de BLSE et de céphalosporinases plasmidique ainsi de carbapénèmases, qui constitue une menace de santé publique majeure à l'échelle mondiale. Et pour cela l'évolution de la résistance bactérienne vis-à-vis les antibiotiques est devenu un problème majeur de santé publique à travers le monde. Il en résulte une plus grande difficulté à traiter les infections sévères, des hospitalisations prolongées et des coûts significatifs pour la collectivité.

Face à l'émergence de nouvelles BLSE et vu l'ampleur et la complexité du problème, des études épidémiologiques seront nécessaires pour évaluer de façon précise la distribution de ces  $\beta$ -lactamases qui pourraient émerger plus dans le futur, mais aussi des mesures d'hygiène strictes restent indispensables à mettre en œuvre, ainsi des méthodes appropriées doivent être munies pour détecter l'émergence de nouvelles enzymes et leur caractéristiques tel que les BLSE qui prennent une place de plus en plus importante parmi les bactéries multirésistantes et des micro-organismes producteurs de ces derniers, afin de limiter la dissémination des gènes de résistance et lutter contre ces BMR et aussi l'éclosion d'épidémies hospitalières, ces mesures consistent entre autre, un bon et un moindre usage des antibiotiques guidée par les résultats de l'antibiogramme, le dépistage et l'isolement des patients porteurs de bactéries multirésistantes, comprendre les mécanismes de transmission de ces bactéries, trouver les déterminants de la résistance, développer l'équipement des laboratoires de

microbiologie par le matériel approprié pour la détection rapide et fiable des gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques, la formation et la sensibilisation du personnel soignant et aide-soignant sur le problème de la résistance aux antibiotiques, la mise en place des réseaux de surveillance des bactéries multirésistantes.

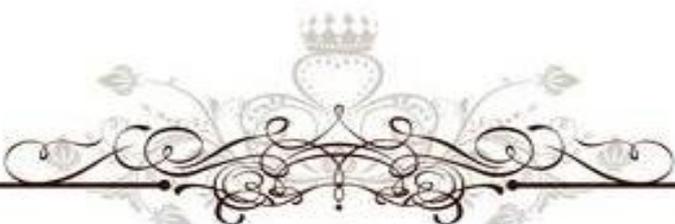
Par ailleurs, la vente et l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire devraient être mieux réglementés afin de limiter la diffusion des souches multirésistantes dans la communauté et chez les animaux, qui semble être en étroite relation avec la diffusion de ces souches en milieu hospitalier. Une collaboration multidisciplinaire étroite doit être établie avec une restriction entre les acteurs de santé : biologistes, hygiénistes, Infectiologues cliniciens et vétérinaires, dans le but de résoudre ce problème.

En perspective de ce travail, nous souhaitons d'élargir cette étude par une grande population de personne avec plus de détails concernant :

- ✓ Le contrôle des bactéries.
- ✓ Élargir l'étude des mécanismes de résistance en incluant d'autres espèces non actuellement étudiées.
- ✓ La caractérisation moléculaire de l'activité des  $\beta$ -lactamases.
- ✓ Étude de l'environnement génétique des gènes de BLSE.

Il serait intéressant d'identifier :

- ✓ Les  $\beta$ -lactamases impliquées dans la résistance observée.
- ✓ La structure génétique qui les portent et les réarrangements génétiques à l'origine de l'extension de leur spectre de résistance.
- ✓ Il est nécessaire de typer génétiquement les souches.



*Références bibliographiques*



**A**

**Achkour Z. 2012.** Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V - Rabat. 60P.

**Afssaps. 2005.** Spectres d'activité Antimicrobienne. 251P.

**Aggoun L. 2012.** Activité antibactérienne et inhibitrice de  $\beta$ -lactamases des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas - Sétif. 92P.

**Aldred K. J., Kerns R. J. & Osheroff N. 2014.** Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, **53** : 1565-1574.

**Arlet G., Brami G., Décrè D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange H. P, Philippon A. 1995.** Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiology Letters*, **134** : 203-208.

**Avril J.L., Dabernat H., Denis F and Montiel H. 2000.** Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Ellipses. Paris. P 8-28.

**Ayad A. 2017.** Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen. 147P.

**B**

**Bactériologie. 2003.** Service de Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie. 122P.

**Baba Ahmed-KaziTani Z et Arlet G. 2014.** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, **62** : 169-178.

**Bakhoum I.M.N.S. 2004.** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse de Doctorat. Université Chiekh Anta Diop de Dakar. 113P.

**Battraud P. 2017.** La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité ? Thèse de Doctorat. Université de Lille 2. 128P.

**Baudet P. et Hagemann G. 1954.** Purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus*. *Brèves communications*, **9** : 374-376.

**Berthelot P., Grattard F., Mallaval F. O., Ros A., Lucht F. & Pozzetto B. 2005.** Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol*, **53** : 341-348.

**Berthuin J. & Miras M. 2018.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique et économique. 27P.

- Bevilacqua S. 2011.** Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré. 139P.
- Bidet P. et Bingen E. 2007.** Enterobacteriaceae. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P : 331-360.
- Bidet. 2018.** Antibiotiques : mécanismes d'action, mécanismes de résistances. 18P.
- Bonnet R. 2004.** Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases : the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48** (1) : 1-14.
- Bonnet R., Sampaio J. L. M., Chanal C., Sirot D., De Champs C., Viallard J. L., Labia R., & Sirot J. 2000.** A Novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44** (12) : 3061-3068.
- Bourguignon L., Goutelle S. 2018.** Polymyxines. *Pharmacologie des anti-infectieux*, 109-112.
- Boussoualim N. 2002.** Caractérisation biochimique d'une  $\beta$ -lactamase isolée d'une souche d'*E.coli* résistante à l'acide clavulanique. Etude des activités de certains flavonoïdes. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas - Sétif. 82P.
- Boutal H. 2017.** Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat. Université Paris-Saclay. France. 243P.
- Boyer A., Mzali F., Clouzeau B., Gruson D. 2013.** Bactéries multirésistantes dans les unités d'urgences c'est au pied du mur qu'on voit mieux le mur. 17P.
- Bradford P. A. 1999.** Automated Thermal Cycling Is Superior to Traditional Methods for Nucleotide Sequencing of *bla*SHV Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** (12) : 2960-2963.
- Bradford P. A. 2001.** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews.* **14** (4) : 933-951.
- Bush K. & Jacoby G. A. 2009.** Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54** (3) : 969-976
- Bush K., Jacoby G. A., & Medeiros A. A. 1995.** A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **39** (6) : 1211-1233.
- Buxeraud J. & Faure S. 2016.** Les quinolones et les sulfamides. *Actualités pharmaceutiques*, **558** : 17-22.

## C

- Carbannelle E., Nassif X. 2011.** Utilisation en routine du MALDITOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences*, **27** (10) : 882-288.
- Cattoir V. 2004.** Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie Biologie*, **52** : 607-616.
- Cattoir V. 2008.** Les nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation*, 203-209.
- Cavallo J. D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. & Garrabé E. 2004.** Bêtalactamines. *EMC - Maladies Infectieuses*, **1** : 129-202.
- Chanawong A., M'Zali F. H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P. M. 2000.** Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiology Letters*, **184** : 85-89.
- Chanawong, A., M'zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & Hawkey, P. M. 2001.** Discrimination of SHV beta-lactamase genes by restriction site insertion-PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, **45** (7) : 2110-2114.
- Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé É., Fraipont C., Frère J-M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Josette Lamotte-Brasseur J., Nguyen-Distèche M. 1998.** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *médecine/sciences*, **14** (5) : 544-555.
- Chassagne C. 2012.** Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. 111P.
- Chiang F-T., Hsu K-L., Tseng C-D., Hsiao W-H., Lo H-M, Tser-Haw Chern T-H & Tseng Y-Z. 1997.** Molecular variant M235T of the angiotensinogen gene is associated with essential hypertension in Taiwanese. *Journal of Hypertension*, **15** (6) : 607-611.
- Chidiac C., Cavallo J D., Cohen R., Dupon M., Galperine T., Garraffo R., Garo B., Gauzit R., Gavazzi G., Kouzan S., Varon E., Lecompte T., Leroy O., Senneville E., Tattevin P., Thiebault-Bertrand A., Voiriot P. 2015.** Mise au point sur le bon usage des fluoroquinolones administrées par voie systémique chez l'adulte (ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine, norfloxacine, ofloxacine, péfloxacine). 64P.
- Chouh F., Siad R., Chater A. 2019.** Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatif isolés à partir des urines au laboratoire de microbiologie au CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou durant l'année 2018. Mémoire en pharmacie. 88P.

**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CFA-SFM).** Recommandations 2018. Société Française de Microbiologie. 134P.

**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CFA-SFM).** Recommandations 2019. Société Française de Microbiologie. 144P.

**Coudron E. P. 2005.** Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (8) : 4163-4167.

**Courdon P. E., Moland E. S. et Thomson K. S. 2000.** Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** : 1791-1796.

**Coudron E. P., Moland S. E., Sanders C. C. 1997.** Occurrence and Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center : Seek and You May Find. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (10) : 2593-2597.

**Courcola R. 2009.** Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? *Elsevier Masson SAS*, **416** : 61-64

**Courvalin P. 1991.** Genotypic Approach to the Study of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **35** (6) : 1019-1023.

**Cristian C. 2008.** Microbiologie Hygiène Base microbiologiques de la diététique. Ed. TEC & DOC Lavoisier, Paris. p.76-86, 257.



**Debabza M. 2015.** Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba. 217P.

**Denis F, H. Monteil, Avril J-L, Dabernat H. 1998.** Bactériologie clinique Edition marketing. Paris.144-145p.

**Descy J., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Huynen P., De Mol P. 2010.** Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Rev Med Liège*. **65** : 29-34.

**Dortet L., Agathine A., Naas T., Cuzon G., Poirel L. & Nordmann P. 2015.** Evaluation of the RAPIDEC(R) CARBA NP, the Rapid CARB Screen(R) and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, **70** : 3014-22.

**Dortet L., Gaëlle Cuzon G. & Nordmann P. 2014.** Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. Hôpital de Bicêtre, Service de Bactériologie-Hygiène. 13P

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

**Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. 2008.** Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae : review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* **14** (1) : 90-103.

**Dubouix A. & Marty N. 2004.** Détection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantages, limites. *Antibiotiques*, **6** : 193-201.

## E

**El Abdani S. 2016.** Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat. 151P.

**El Bouamri M.C. 2017.** Etude epidemio-moleculaire des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases a spectre élargi au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat. 144P.

**Elhani D. 2012.** Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Ann. Biol. Clin.* **70** (2) : 117-140.

**Essack S.Y. 2000.** Laboratory detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) —The need for a reliable, reproducible method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **37** : 293-295.

## F

**Faure S. 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines *bla*CTX-M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1. 184P.

**Foulal L. 2013.** Profil épidémiologique des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi diagnostiquées au sein du laboratoire de microbiologie du CHU de rabat. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V - Souissi - Rabat. 110P.

## G

**Gangoue P. J. 2007.** Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat. Université de Liège. Belgique. 104P.

**Garrec H., Drieux-Rouzet. L., Golmard J-L., Jarlier V., Robert J. 2011.** Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production by Enterobacteriaceae. *Jornal of Clinical Microbiology.* **49** (3) : 1048-1057.

**Gellert M., O'dea M.H., Itoh T. & Tomizawa J-I. 1976.** Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Biochemistry*, **73** (12) : 4474-4478.

**Gharout-Sait A. 2016.** Etude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries hospitalières et communautaires. Thèse de Doctorat. Université Abderrahmane MIRA - Béjaïa. 195P.

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

**Grare M. 2009.** De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène. Etude moléculaire (s), cellulaire (s) et structurale (s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-guanidinoéthylcalix[4]arène. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-I. 263P.

**Gruson D., Hilbert G., Vargas F., Valentino R., Cardinaud J.P., Gbikpi-Benissan G. 2002.** Impact des nouvelles stratégies d'utilisation des antibiotiques en réanimation. *Réanimation*, **11** : 200-8.

**Guillot J.F. 1989.** Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Ann. Rech. Vét.*, **20** : 3-16.

**Gupta V. 2007.** An update on newer  $\beta$ -lactamases. *Indian J Med Res.* **126** : 417-427.

## H

**Hall B. G. & Barlow M. 2005.** Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55** : 1050-1051.

**Haytham Y. 2015.** Etude de la séquence d'insertion IS1294b et de son implication dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux. 142P.

**Hnich H. 2017.** La résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 148P.

**Ho P.L., Chowa K.H., Yuena K.Y., Ngb W.S., Chaua P.Y. 1998.** Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42** : 49-54.

**Hooper D.C. 2001.** Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, **7** (2) : 337-341.

**Howard, C., Van Daal, A., Kelly, G., Schooneveldt, J., Nimmo, G. & Giffard, P. M. 2002.** Identification and minisequencing-based discrimination of SHV  $\beta$ -lactamases in

nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother*, **46** (3) : 659-64.

## I

**INESSS. 2017.** Le classement des substances Polymyxine B et ses sels et Gramicidine et ses sels pour un usage oto-ophtalmique. Québec. 29P.

## J

**Jacoby, G. A. 2009.** AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **22** (1) : 161-182.

**Jarlier V., Carbonne A., Astagneau P. et Coignard B. (2003).** Cas groupés d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistantes à toutes les bêta-lactamines y compris à l'imipénème en région parisienne. Edition InVS, p84.

**Joly B., & Reynaud A. 2002.** Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. ED TCE & DOC et ED médicales Inter Nationales. Paris. 356P.

## K

**Kim J. & Lee H-J. 2000.** Rapid Discriminatory Detection of Genes Coding for SHV  $\beta$ -Lactamases by Ligase Chain Reaction. *Antimicrob. Agents Chemother*. **44** (7) : 1860-1864.

**Kiouba J-C. 2002.** L'usage des antibiotiques en milieu hospitalier. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 75P.

## L

**Lagha N. 2015.** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 84P.

**Laurence Monnoyer-Smith L. 2018.** Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : une infection évitée, c'est un antibiotique préservé ! Santé publique France, 17P.

**Lavergne M., Cayouette M., Boisvert J-F., Boukhoudmi S., Anaïs Lauzon-Laurin A. 2014.** Familles d'antibiotiques. 19P.

**Le Minor L. et Veron M. 1989.** Bactériologie médicale. 2e édition. Edition Flammarion Médecine-Sciences. Paris. p.312-459.

**Liassine N. 2000.** Problème des pathogènes à Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweiz Med Wochenschr*, **130** : 1930-1936.

**Livermore D. M. 1995.**  $\beta$ -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8** (4) : 557–584.

**Livermore D. M. 2008.** Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.*, **14** (1) : 3-10.

**Livrelli V., Boonet R., Joly B and Darfeuille-Michaud A. 2007.** *Escherichia coli* et autre *Escherichia*, *Shigella*. In **Freney J., Renaud F., Leclercq R and Reigel P.** Précis de bactériologie clinique. Edition ESKA. P989-1004.

**Lozniewski A., Rabaud C., Nancy. 2010.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins. 4P.

## M

**Mabilat C., Courvalin P. 1990.** Development of "Oligotyping" for Characterization and Molecular Epidemiology of TEM  $\beta$ -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **34** (11) : 2210-2216.

**Madigan M. et Martinko J. 2007.** Biologie des micro-organismes. 11ème Edition. PEARSON Education, France. p.354-355.

**Mangin L. 2016.** Antibiotiques et résistances : enquête sur les connaissances et les comportements du grand public. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. 104P.

**Martin C. 2007.** Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. P : 368-381.

**Medboua C. 2011.** Caractérisation des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Thèse de Doctorat. Université Abderrahmane MIRA - Béjaïa. 88P.

**Meunier D., Vickers A., Pike R., Hill R. L., Woodford N. & Hopkins K. L. 2016.** Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, **71** : 2357-9.

**Minor L. 1989.** Bactériologie médicale. Edition Science, Paris, 333-318 ; 773-823.

**Muylaert A., Mainil J.G. 2012.** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.*, **156** : 109-123

**Muylaert A., Mainil J.g. 2013.** Quinolones et fluoroquinolones : des décennies de développement et d'utilisation. Le point sur les molécules vétérinaires Partie 1 : le regard du bactériologiste. *Ann. Méd. Vét.*, **157** : 72-81.

## N

**Naas T., Poirel L. & Nordmann P. 2008.** Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, **14** (1) : 42-52.

**Ndiaye A.O.K. 2005.** Les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases a spectre élargi. Thèse de Doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 65P.

**Nordmann P. 2010.** Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. *Med. Sci. (Paris)*, **26** (11) : 950-959.

## O

**Organisation mondiale de la santé animale (OIE). 2015.** L'antibiorésistance. 2P.

**Ouaidy O. 2013.** Les quinolones en néonatalogie : indications et effets secondaires. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 183P.

**Ouellette M., Paul C.G., Philippon M. P., Roy H. P. 1989.** Oligonucleotide Probes (TEM-1, OXA-1) versus Isoelectric Focusing in  $\beta$ -Lactamase Characterization of 114 Resistant Strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **32** (3) : 397-399.

## P

**Pages J-M., Garnotel E. 2003.** Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif. *Revue Française des Laboratoires*, **352** : 57-63.

**Pavlovic M., I., Konrad R. & Busch U. 2013.** Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open.Microbiol.J*, **7** : 135-141.

**Philippon A. 2016.** Classification moléculaire des  $\beta$ -lactamases de classe A et bioinformatique. *Bull. Acad. Vét. France*, 54-56.

**Philippon A., Arlet G. & Jacoby G. A. 2016.** Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46** (1) : 1-11.

**Philippon A., Paul G. et Nevot P. 1989.** Classification des bêta-lactamases. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 6-18.

**Poirel L. & Nordmann P. 2015.** Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol*, **53** : 3003-8.

**Poole K. 2004.** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **61** : 2200-2223.

## R

- Rachidi Z. 2013.** Carbapenemases : nouvelles techniques de dépistage et recommandations. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V - Souissi - Rabat. 152P.
- Randegger C.C. & Hachler H. 2001.** Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **45** (6) : 1730-1736.
- Rhimi-Mahjoubi F., Bernier M., Arlet G., Ben Jemaa Z., Jouve P., Hammami A., Philippon A. 2002.** Mise en évidence de la céphalosporinase plasmidique ACC-1 dans différentes entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolées dans un hôpital tunisien (Sfax 1997–2000). *Pathol. Biol.*, **50** : 7-11.
- Riethmuller J. 2013.** La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes. Etude prospective aux Hôpitaux Civils de Colmar du dépistage avec un milieu sélectif et intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour le criblage. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. 160P.
- Rodriguez-Villalobos H., Struelens M.-J. 2006.** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*. **15** : 205-2013.
- Routaboul F. 2011.** Hypersensibilité aux sulfamides antibactériens dans le syndrome de Stevens-Johnson. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. 105P.
- Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques journal*, **12** : 3-16.

## S

- Sanders P., Perrin-Guyomard A., Moulin G. 2017.** Évolution de l'utilisation des antibiotiques en production animale. *Cahiers de nutrition diététique*, **381** : 1-11.
- SOMIPEV. 2017.** Guide pratique des bactéries pathogènes. 99P.
- Soroka D. 2016.** Rôle du motif SDN dans l'inhibition et l'activité des  $\beta$ -lactamases des mycobactéries. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie. 130P.
- Stahl J-P. 2008.** Fluoroquinolones. Maladies Infectieuses-CHU Grenoble. 55P.
- Steward, C. D., Rasheed, J. K., Hubert, S. K., Biddle, J. W., Raney, P. M., Anderson, G. J., Williams, P. P., Brittain, K. L., Oliver, A., MCGowan, J. E., JR. & Tenover, F. C. 2001.** Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Detection Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (8) : 2864-2872.

**Stratton W.C. 2002.** Chloramphenicol. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter* **18** (12) : 89-91.

**Suarez S. 2013.** Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de Doctorat. Université Paris Descartes. 115P.

**Sylvie C. 2009.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel*, **42** : 6-21.

## T

**Thériault W. 2015.** Évaluation de l'acquisition de la résistance à la colistine chez *Escherichia coli* O149 chez le porc. Université de Montréal. 93P.

**Tiouiri Benaissa H. 2008.** Les fluoroquinolones. Collège des Maladies Infectieuses Microbiologie - Parasitologie - Mycologie. 77P.

**Touati M. 2013.** Antibiorésistance des bacilles à Gram négatif non fermentant isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba. 137P.

## V

**Vallée M. 2015.** Résistance aux  $\beta$ -lactamines à large spectre chez les bactéries à gram négatif, Épidémiologie et diagnostic. Université de Laval. Canada. 113P.

**Van Bambeke F., Tulkens P., Youri Glupczynski Y., Mingeot-Leclercq M-P & Etienne Sonveaux E. 2008.** Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse, 1. Antibiotiques, 2. Antifongiques. Syllabus national belge de pharmacologie, Bruxelles. 202P.

**Vernhet A., Licznar-Fajardob P., Jumas-Bilakb E. 2016.** Antibiorésistance, quels rôles pour le pharmacien d'officine ? *Actualités pharmaceutiques*, **55** : 37-40.

**Vora S. & Auckenthaler R. 2009.** Que signifie « bêtalactamases à spectre élargi » en pratique ? *Rev Med Suisse*, **5** : 1991-1994.

## W

**Wiegand I., Geiss H. K., Mack D., Stürenburg E., Seifer H. 2007.** Detection of Expanded-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (4) : 1167-1174.

Y

**Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N. 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, **91** : 6-12.

Z

**Ziai S. 2014.** La résistance bactérienne aux antibiotiques : apparition et stratégies de lutte. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. 147P.

**Zink L. 2012.** Synthèse De Derives 5-Nitroimidazoles A Potentialites Anti-Infectieuses. Thèse de Doctorat. AIX-Marseille Université. 298P.



# *Annexes*

## Annexe 1

**Tableau IX : Phénotypes de résistance naturelle de principales espèces d'entérobactéries (CFA-SFM, 2018; CFA-SFM, 2019).**

Espèces ATB	AMP	AMIB	TIC/ PIP	C1G	FOX	CXM	GEN	TOB	TET	TIG	COL	NIT
<i>C. freundii</i> , <i>C. braakii</i> , <i>C. murlinae</i> , <i>C. werkmanii</i> , <i>C. youngae</i>	R	R		R	R							
<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. sedlakii</i> , <i>C. farmeri</i> , <i>C. rodentium</i>	R		R	R		R						
<i>E. aerogenes</i>	R	R		R	R							
<i>E. cloacae</i> complex	R	R		R	R						R*	
<i>E. hermannii</i>	R		R									
<i>H. alvei</i> , <i>H. paraalvei</i>	R	R		R							R	
<i>Klebsiella</i> spp., <i>Raoultella</i> spp., <i>C. koseri</i>	R		R									
<i>M. morgani</i>	R	R		R					R	R	R	R
<i>P. mirabilis</i>	R								R	R	R	R
<i>P. vulgaris</i> , <i>P. penneri</i>	R			R		R			R	R	R	R
<i>P. rettgeri</i>	R	R		R		R			R	R	R	R
<i>P. stuartii</i>	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R
<i>S. marcescens</i>	R	R		R	R	R		R	R		R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R	R	R	R							

**R** : résistant ; **R\*** : résistance hétérogène observée dans plusieurs sous-groupes phylogénétiques ; **AM** : aminopénicillines ; **AMIB** : aminopénicillines-inhibiteur de bêta-lactamase ; **TIC** : ticarcilline ; **PIP** : piperacilline ; **C1G** : céphalosporine de première génération (céfazoline, céfalotine, céfalexine, céfadroxil) ; **FOX** : ceftioxime ; **CXM** : céfuroxime ; **TOB** : tobramycine ; **TET** : tétracycline ; **TIG** : tigécycline ; **COL** : colistine ; **NIT** : nitrofurantoïne.

## Annexe 2

**Tableau X** : Principaux caractères d'orientation des bacilles à Gram négatif non fermentaires  
(Martin, 2007).

Genre Espèce	Morphologie	Croissance sur gélose T5	Mobilité	Oxydase	Pigmentation	Colistine	Indole	Saccharose	H2S (TSD)
<i>Pseudomonas</i>	b	+	+	+	V	S	-	V	
<i>Burkholderia</i>	b	+	+	+	-	R		V	
<i>Pandoraea</i>	b	+	+	V	-				
<i>Ralstonia</i>	b	+	+	+	-			-	
<i>Brevibacterium</i>	b	+	+	+	+		-	-	
<i>Comamonas</i>	b	+	+	+	V		-	-	
<i>Stenophomonas</i>	b	+	+	+	+	V	-	-	
<i>Mallophilia</i>	b	+	+	-	+		-	V	
<i>Acinetobacter</i>	c/cb	+	-	-	-		-		
<i>Bordetella</i>	b/cb	V	V	V	V			-	
CDC groupe EO-5	c	+	-	-	V			-	
CDC groupe NO-1	cb	+	-	-	-			-	
<i>Moraxella, Oligella</i>	c/cb	V	-	+	-		-		
<i>Chryseobacterium</i>	b	+	-	+	+	R	+	V	-
<i>Weeksella</i>	b	+	-	+	+		+	-	-
<i>Bergeyella</i>	b	+	-	+	-		+	-	-
<i>Empedobacterbrevis</i>	b	+	-	+	+		+	-	-
<i>Balneatrix</i>	b	+	+	+	+		+	-	-
<i>Schewanella</i>	b	+	+	+	+	S	ND	-	+
<i>Alcaligenes</i>	b	+	+	+			-	-	-
<i>Achromobacter</i>	b	+	+	+			-	-	-
<i>Agrobacterium</i>	b	+	+	+	V		-	-	-
<i>Ochrobactrumantropi</i>	b	+	+	+	-	V	-	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	b	+	+	+	+	V	-	-	-
<i>Sphingobacterium</i>	c/cb	+	-	+	+		-		-
<i>Myroides</i>	c	+	-	+	+		-		-
CDC groupe EO-2 et 3	c/cb	+	-	+	V		-		-

**b** : bacille ; **c** : cocci ; **cb** : coccobacille ; **R** : résistant ; **S** : sensible ; **V** : variable ; **ND** : non déterminé.

### Annexe 3

**Tableau XI : Phénotype de résistance des bacilles a Gram négatif non fermentaire (CFA-SFM, 2019).**

<b>COL</b>				R	R			R	
<b>FOS</b>		R		R			R	R	
<b>TRS</b>							R		
<b>TMP</b>		R	R	R			R	R	
<b>CHL</b>		R		R			R	R	
<b>FQ</b>				R					
<b>AMI</b>	R	R	R	R	R		R	R**	
<b>MER</b>					R			R	
<b>IMP</b>					R			R	
<b>ERT</b>	R	R	R	R	R		R	R	
<b>AZT</b>		R	R	R	R		R	R	
<b>CEP</b>			R		R		R		
<b>CAZ</b>					R		R		
<b>C1,C2 CTA CTR</b>	R	R	R	R	R		R	R	
<b>PIT</b>							R	R	
<b>PIP</b>							R	R	
<b>TCC</b>					R				
<b>TIC</b>				R	R		R	R	
<b>AM, AMIB</b>	R	R	R	R	R		R	R	
<b>Espèces</b>	Bacilles à Gram négatif non fermentaires	<i>A. baumannii</i>	<i>A. xylooxidans</i>	<i>B. cepacia</i> compl ex	<i>Elizabethking</i>	<i>iameningosep ti-ca</i>	<i>O. anthropi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>

\*\* La résistance intrinsèque aux aminosides est observée uniquement après incubation à 30°C.

**R** : résistant ; **AM** : aminopénicillines ; **AMIB** : aminopénicillines-inhibiteur de bétalactamase ; **TIC** : ticarcilline ; **TCC** : ticarcilline-acide clavulanique ; **PIP** : pipéracilline ; **PIT** : pipéracilline-tazobactam ; **C1, C2G** : céphalosporines 1ère et 2ème génération ; **CTA** : céfotaxime ; **CTR** : ceftriaxone ; **CAZ** : ceftazidime ; **CEP** : céfépime ; **AZT** : aztréonam ; **ERT** : ertapémène ; **IMP** : imipénème ; **MER** : méropénème ; **AMI** : aminosides ; **FQ** : fluoroquinolone ; **CHL** : chlorampénicol ; **TMP** : trimétoprime ; **TRS** : trimétoprime-sulfaméthoxazole ; **FOS** : fosfomycine ; **COL** : colistine.

## Résumé

Ce travail avait pour objectifs d'étudier, de caractériser, de citer les méthodes de détection, l'évolution et la classification des enzymes qui confèrent une résistance aux bacilles à gram négatif vis-à-vis les antibiotiques, ce sont les  $\beta$ -lactamases qui sont des enzymes d'inactivation des  $\beta$ -lactamines. Cette résistance s'effectue par différents mécanismes qui se terminent par l'excrétion de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule bactérienne, dans le but de défense. Ces enzymes sont produites par un grand nombre d'espèce bactérienne, chacun à ses caractéristiques, permettant de les classer en divers types (pénicillinases, BLSE, céphalosporinases et carbapénèmases) à base fonctionnelle et moléculaire. Les enzymes les plus anciennes sont les pénicillinases et les  $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV et OXA, après avoir des mutations, elles sont devenues des BLSE. L'évolution de ces enzymes conduit à l'apparition des nouvelles  $\beta$ -lactamases de type CTX-M, PER, VEB, OXA, puis l'apparition de céphalosporinases (C1G, C2G, C3G et C4G) et les carbapénèmases. En fin, en vue de détecter l'émergence de toutes ces enzymes et leurs caractéristiques, ils ont employé des techniques microbiologiques en utilisant des antibiogrammes et de plusieurs tests tels que le test de synergie, le test Vitek..., ainsi les techniques moléculaires comme la PCR, le séquençage, les sondes d'ADN, etc. Ces enzymes prennent une place de plus en plus importante parmi les bactéries multirésistantes, constituant une menace de santé publique majeure à l'échelle mondiale.

**Mots clés :** BGN, Enzymes, Antibiotiques,  $\beta$ -lactamases,  $\beta$ -lactamines, inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, BLSE, Résistance bactérienne.

## Abstract

The objectives of this work were to study, characterize, and cite the methods of detection, evolution and classification of enzymes which confer resistance to gram-negative bacilli towards antibiotics, these are  $\beta$ -lactamases which are  $\beta$ -lactamin activating enzymes. This resistance is effected by various mechanisms which end in the excretion of the antibiotic outside the bacterial cell for the purpose of defense. These enzymes are produced by a large number of bacterial species, each with its own characteristics, allowing them to be classified into various types (penicillinases, ESBLs, cephalosporinases and carbapenemas) on a functional and molecular basis. The oldest enzymes are penicillinases and  $\beta$ -lactamases of TEM, SHV and OXA type, after having mutations, they have become ESBLs. The development of these enzymes leads to the appearance of new  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, PER, VEB, OXA type, followed by the appearance of cephalosporinases (C1G, C2G, C3G and C4G) and carbapenemases. Finally, in order to detect the emergence of all these enzymes and their characteristics, they used microbiological techniques using antibiograms and several tests such as the synergy test, the Vitek test, etc., as well as molecular techniques such as PCR, sequencing, DNA probes, etc. These enzymes are becoming more and more important among multidrug-resistant bacteria, posing a major public health threat worldwide.

**Key words :** GNB, Enzymes, Antibiotics,  $\beta$ -lactamases,  $\beta$ -lactams,  $\beta$ -lactamase inhibitors, ESBL, Bacterial resistance.

## ملخص

إن الهدف من هذا العمل هو دراسة ووصف وتحديد طرق الكشف، وتطور تصنيف الأنزيمات التي تمنح مقاومة سالبة الغرام للبكتيريا، اتجاه المضادات الحيوية. إنها إنزيمات البتالاكتاماز التي تعطل البتالاكتامين. تتأثر هذه المقاومة البكتيرية بآليات مختلفة، وتنتهي بإفراز المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية لغرض الدفاع. يتم إنتاج هذه الإنزيمات بواسطة عدد كبير من أنواع البكتيريا، ولكل منها خصائصها الخاصة، مما يسمح بتصنيفها على أساس وظيفي وجزئي الي أنواع مختلفة (البنسليناز، BLSE، سيفالوسبوريناز وكاربابينيماز). أقدم الإنزيمات هي البنسليناز و بيتالاكتاماز من النوع OXA, SHV, TEM, وبعد حدوث طفرات، أصبحت BLSE تؤدي إلى تطوير هذه الإنزيمات إلى وظهور بيتالاكتاماز جديدة من نوع CTX-M, OXA, VEB, PER, يليها ظهور السيفالوسبوريناز C4G, C3G, C2G, C1G والكاربابينيماز. أخيراً، و من أجل الكشف عن ظهور كل هذه الإنزيمات وخصائصها، تستخدم تقنيات ميكروبيولوجية باستعمال المضادات الحيوية، مثل تقنية synergie و vitek وكذلك التقنيات الجزئية مثل pcr، sequencage، sondes d'ADN، الخ. تزداد أهمية هذه الإنزيمات شيئاً فشيئاً من بين البكتيريا المتعددة المقاومة، مما يشكل تهديداً كبيراً على الصحة في جميع أنحاء العالم.

**الكلمات المفتاحية:** BGN، الإنزيمات، المضادات الحيوية، بيتالاكتاماز، بيتالاكتامين، مثبطات البتالاكتاماز، BLSE، مقاومة البكتيريا.