

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention Du diplôme de Master en

Option : Microbiologie

Filière : Biologie

Sous le thème :

Caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence potentielle des souches bactériennes à l'origine d'infections chez les cancéreux

Présenté par :

Youlas Sabiha

&

Bouyaiche Roumeissa

Devant le jury :

Pr. GUETARNI.Dj,	Professeur	USDB1	Président
Dr.Zerouti kh ,	M.A.A	USDB1	Examinatrice
Dr. AÏSSANI-EL FERTAS.R,	M.C.B	USDB 1	Promotrice
Dr.AZROU.S,	MA en microbiologie	USDB1	copromotrice

2018/2019

Remerciements :

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire central du CHU universitaire Frantz Fanon Blida, nous tenons à remercier toute l'équipe travaillant dans l'unité de bactériologie, en particulier madame Amel et madame Samira pour leur accueil chaleureux et leur aide précieuse pour accomplir notre étude.

Nous remercions très chaleureusement Dr. madame AISSANI EL FERTAS RADIA notre promotrice pour tous les efforts fournis durant notre formation et même pendant la réalisation de ce travail. Madame les mots ne suffisent pas pour vous remercier à votre juste valeur, nous avons pris un plaisir immense en travaillant à vos côtés. Votre patience, votre optimisme et votre positivité sont presque contagieux. Malgré les contraintes et les problèmes que nous avons rencontrés, vous avez cru en nous et en nos capacités de réaliser ce travail. Si nous sommes là aujourd'hui c'est grâce à vous et votre dévouement, nous vous sommes reconnaissantes.

Nous souhaitons également remercier notre co-promotrice Dr. Azrou Siham la directrice de l'unité de bactériologie au sein du laboratoire central, pour nous avoir facilité la tâche durant notre stage, pour son accueil parmi son équipe, pour son aide et sa disponibilité.

Nous aimerions aussi adresser notre reconnaissance au Professeur Guetarni pour l'intérêt qu'il a porté vis-à-vis de notre travail, merci monsieur d'avoir accepté et examiné notre travail.

Dr. Madame Zerouti, nous vous sommes reconnaissantes pour l'effort et le temps que vous avez consacré pour examiner notre étude.

Nous voulons remercier madame Rahim pour son aide durant notre expérimentation.

Et à la fin, nous aimerions remercier nos familles et amis pour leur soutien, et leurs encouragements, merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin afin que nous puissions réaliser ce projet de fin d'étude.

Dédicaces

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit. A maman chérie, ma reine, la lumière qui illumine mes jours, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence est ma source d'énergie. Merci d'avoir cru en moi, merci pour ton soutien durant mes études, si ce travail t'est dédié, j'espère avoir pu vous rendre fiers toi et papa !

A mon Papa chéri, tu as toujours été à mes côtés, tu m'as soutenu durant toutes ces années sans jamais te plaindre. Je t'en suis reconnaissante

A mes frères, mes princes Aymen et Fateh , merci pour votre soutien et votre bonne humeur

A mon cher et tendre grand-père, que Dieu vous garde pour nous

A mes chers oncles et tantes, votre nièce vous dédie ce travail

A mes chers cousins, en particulier Yasmine et Wissem qui étaient présentes tout le temps pour moi

Aux sœurs que je n'ai pas eu Ikram et Hala, qui m'ont supporté et soutenu, durant toutes ces années, mes confidentes je vous dédie ce travail

A ma collègue, Sabiha ce travail est le fruit tant attendu, nous avons passé des épreuves que toi seule pourrais comprendre, tu as été une excellente partenaire qui me comprenait sans même prononcer un mot. Ce travail t'est dédié.

A la mémoire de ma tante Nora, j'aurai aimé te voir ici présente parmi nous, je te dédis aujourd'hui ma réussite.

A la mémoire de mon grand-père maternel et mes deux grands -mères, oncle Ismaïl et tante Farida que Dieu puisse vous accueillir dans son vaste paradis .

Roumeissa

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma mère qui m'a toujours soutenu et encouragé durant mon parcours scolaire, à mon père que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Mes sœurs : Badia et son époux Imed, Soumia et son époux Abdou, Nouria et mon petit et seul frère Anouar.

A Roumeïssa qui m'a accompagné pendant ces années, avec qui j'ai partagé mon chemin, des moments de fatigue, de travail, et de stress, mais aussi de joie, de rire et de bonheur.

A tonton Lahbib Bouyaïche et sa femme tata Naima, je n'oublierai jamais votre soutien et votre gentillesse excessive.

A Mes amies Amel, Nihad et Aïcha

Je dédie aussi ce travail à mon cher ami Abdellah qui était toujours à mes cotés pour m'encourager

Sabiha

Plus fréquentes et/ou plus graves que chez les malades non cancéreux, les infections sont une cause majeure de décès chez les individus atteints de cancer. Dans ce cadre, avons réalisé une étude sur l'antibiorésistance et la virulence de souches bactériennes isolées chez des patients cancéreux suivis à l'hôpital Franz Fanon de Blida.

Sur un total de 203 de prélèvements différents, 81(39.9%) incriminaient des agents pathogènes avec une prédominance des prélèvements de pus (47.74%), suivi par le sang (17.11%). les prélèvements positifs étaient prévalent chez les hommes comparés aux femmes avec un taux de 58%. Nous avons remarqué que la moitié des patients (50.62%) étaient traités pour une leucémie, et la majorité d'entre eux ont été soumis à des cycles de chimiothérapie (54.32%).

Nous avons isolé 111 souches bactériennes, dont 69.36% de bacilles à Gram négatif avec une prédominance des entérobactéries (63 souches). Nous avons évalué et caractérisé la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques principalement les β -lactamines, les aminosides, les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones, les tétracyclines et les sulfamides et association. En plus de la multirésistance (47.74%) et de la diversité des profils de résistance aux antibiotiques (75 profils), nous avons mis en évidence le phénotype β -lactamases à spectre élargie « BLSE » chez 29.12% des souches et le phénotype résistants à la méthicilline « SARM » chez 4.85% des souches.

L'étude de la virulence n'a concerné que les souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ; elles étaient au nombre de 40. Nous avons recherché des facteurs de virulence communs aux entérobactéries et d'autres spécifiques. 39 des souches étaient résistantes au système du complément, avaient un pouvoir hémolytique et formaient un biofilm. La capsule était présente chez toutes les klebsielles qui ne possédaient pas le phénotype d'hypermucoviscosité. Les souches de *Serratia marcescens* étaient non pigmentées et avait un potentiel de virulence important testé sur un modèle murin de BALB/C.

Ces résultats sont alarmants car ils révèlent des associations, potentiellement morbides, entre la résistance aux antibiotiques et la virulence. Ceci est d'autant plus inquiétant quand les individus concernés sont dans état d'immunodépression quasi-chronique du fait du cancer.

Mots clés : Cancer, infection bactérienne, antibiorésistance, virulence.

Abstract :

More frequent and/or more serious than in non-cancer patients, infections are a major cause of death in individuals with cancer. We conducted a study on the antimicrobial resistance and virulence of isolated bacterial strains in cancer patients followed at Franz Fanon Hospital in Blida.

Of a total of 203 different samples, 81(39.9%) incriminated pathogens with a predominance of pus samples (47.74%), followed by blood (17.11%). positive samples were prevalent among men compared to women with a rate of 58%. We noticed that half of the patients (50.62%) were treated for leukemia, and the majority of them underwent cycles of chemotherapy (54.32%).

We isolated 111 bacterial strains, including 69.36% Gram-negative bacilli with a predominance of *Enterobacteriaceae* (63 strains). We evaluated and characterized the resistance to several families of antibiotics mainly β -lactams, aminoglycosides, macrolides and related, fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides and combination. In addition to multidrug resistance (47.74%) and diversity of antibiotic resistance profiles (75 profiles), we found the extended ESBL β -lactamase phenotype in 29.12% of resistant strains and phenotype methicillin resistant *staphylococcus aureus* "MRSA" in 4.85% of the strains.

The study of virulence only concerned strains belonging to the family Enterobacteriaceae; there were 40 of them. We looked for common virulence factors in *Enterobacteriaceae* and other specific ones. 39 were resistant to the complement system, had hemolytic potency and formed a biofilm. The capsule was present in all klebsials that did not have the hypermucoviscosity phenotype. *Serratia marcescens* strains were unpigmented and had high virulence potential tested on a murine model of BALB / C.

These results are alarming because they reveal potentially morbid associations between antibiotic resistance and virulence. This is all the more worrying when the individuals concerned are in a state of near-chronic immunodepression due to cancer.

Key words: Cancer, bacterial infection, antimicrobial resistance, virulence.

ملخص:

تعد العدوى الجرثومية أكثر سبباً و / أو أكثر خطورة عند المصابين بالسرطان. في هذا السياق أجرينا دراسة عن مقاومة المضادات الحيوية و الفوعة لدى البكتيريا المعزولة عند مرضى السرطان الخاضعين للعلاج في مستشفى فرانتز فانون في البلدة.

من مجموع 203 عينة مختلفة ، كانت 39.9 ٪ تحمل بكتيريا مسببة للعدوى مع غلبة عينات القيح (47.74 ٪) ، تليها الدم (17.11 ٪). كانت العينات الإيجابية سائدة بين الرجال مقارنة مع النساء بمعدل 58 ٪. لاحظنا أن نصف المرضى (50.62 ٪) عولجوا من سرطان الدم، وأن معظمهم خضعوا لدورات من العلاج الكيميائي (54.32 ٪).

عزلنا 111 سلالة بكتيرية ، بما في ذلك 69.36 ٪ عصيات سلبية الغرام مع غلبة *Enterobacteriaceae* . قمنا بتقييم ووصف المقاومة للعديد من عائلات المضادات الحيوية بشكل رئيسي : البيتا لكتامينات، الأمينوغليكوزيدات ، الماكروليدات وما يتصل بها ، الفلوروكينولونات ، التتراسيكلين والسلفوناميدات. بالإضافة إلى المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (47.74 ٪) وتنوع أشكال مقاومة المضادات الحيوية (75 صورة) ، وجدنا النمط الظاهري- ESBL الممتد في 29.12 ٪ من السلالات المقاومة والنمط الظاهري لمقاومة الميثيسيلين "MRSA" في 4.85 ٪ من السلالات.

دراسة الفوعة فقط عند السلالات التي تنتمي إلى عائلة *Enterobacteriaceae*. كان هناك 40 منهم . بحثنا عن عوامل الضراوة الشائعة والخاصة. كانت 39 مقاومة للنظام المتمم، ولديها قوة انحلالية وشكلت غشاء حيوي. كانت الكبسولة موجودة في جميع klebsielles التي لم يكن لديها النمط الظاهري فرط المخاطية. كانت سلالات *Serratia marcescens* لا تنتج اصبغة ولديها قدرة عالية من الفوعة على اختبار نموذج الفئران من BALB / C. هذه النتائج مثيرة للقلق لأنها تكشف عن وجود ارتباطات محتملة بين مقاومة المضادات الحيوية والفوعة. هذا الأمر يثير القلق بشكل أكبر عندما يكون الأفراد المعنيون في حالة من الضعف المناعي شبه المزمن بسبب السرطان.

الكلمات المفتاحية: السرطان ، عدوى بكتيرية ، مقاومة المضادات الحيوية ، الفوعة.

Liste des abréviations :

- AmpC** : Aminopénicillinase à large spectre
- APH(3')-IIb** : Aminoglycoside phosphotransférase chromosomique
- agr** : accessory gene regulator
- BCP** : Bouillon lactosé à l'indicateur de pH pourpre de bromocrésol
- BHIB** : Bouillon cœur cervelle
- BGT** : Bouillon glucosé tamponné
- BlaZ** : β lactamase staphylococcique plasmidique
- BLSE** : β - lactamases à spectre étendu
- CAC** : Centre Anti Cancer
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- C1G** : Céphalosporines de la première génération
- C2G** : Céphalosporines de la deuxième génération
- C3G** : Céphalosporines de la troisième génération
- ccRA/ccRB ou ccRC** : cassette chromosome recombinase
- DDS** : Double Disque Synergie (test BLSE)
- DHPS** : Dihydroptéroate synthétase
- DHFR** : Dihydrofolate réductase
- GN** : Gélose nutritive
- GSC** : Gélose au sang cuit
- GSF** : Gélose au sang frais
- HMV** : Phénotype d'hypermucovisité
- MDR** : Multi Drug Resistance.
- MH** : milieu Muller Hinton
- LB** : milieu Luria-Bertani
- PBS** : Tampon phosphate salin
- PLP2a** : Protéine de liaison à la pénicilline

PR : Profil de résistance

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

SASM : Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline

SCN : Staphylococcus à coagulase négative

SCCmec : Staphylococcal cassette chromosome mec

SHV1 : Pénicillinase chromosomique à spectre étroit

Liste des figures :

- Figure 1 :** Etapes de la cancérogénèse et du processus métastatique 3
- Figure 2 :** Phases du processus « Immunoediting » 4
- Figure 3 :** Facteurs de virulence exprimés par les souches pathogènes d'*E.coli* 11
- Figure 4 :** Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* 13
- Figure 5 :** Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* 16
- Figure 6 :** Répartition des prélèvements biologiques selon la positivité de la culture 27
- Figure 7 :** Répartition des prélèvements biologiques positifs selon le sexe des patients cancéreux 27
- Figure 8 :** Répartition des prélèvements biologiques selon les tranches d'âge des patients cancéreux 28
- Figure 9 :** Répartition des prélèvements biologiques positifs selon le type de cancer. 29
- Figure 10 :** Répartition des prélèvements biologiques positifs selon leur nature 30
- Figure 11 :** Répartition des prélèvements biologiques positifs selon la thérapie anti-cancéreuse 31
- Figure 12 :** Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des β -lactamines 35
- Figure 13 :** Détection du phénotype BLSE par le test DDs 36
- Figure 14 :** Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des aminosides 38
- Figure 15 :** Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des quinolones/fluoroquinolones 39
- Figure 16 :** Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des tetracyclines, sulfamides et association 40
- Figure 17 :** Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain sur nos souches 43
- Figure 18 :** Résultat de la recherche de la formation de biofilm par au cristal violet sur microplaque de 96 puits 44
- Figure 19 :** Activité hémolytique d'une souche d'*E. coli* 46
- Figure 20 :** Culture de *S. marcescens* sur gélose Muller Hinton révélant des colonies blanchâtres qui poussent selon un mouvement de « swarming » 47

Figure 21: Taux de survie des souris BALB/c au sepsis induit par différentes doses de *Serratia marcescens* 48

Liste des tableaux :

- Tableau I :** Facteurs liés au risque infectieux chez les cancéreux 7
- Tableau II :** Principaux germes incriminés dans les infections chez les cancéreux 9
- Tableau III :** liste des antibiotiques testés dans la réalisation de l'antibiogramme (**Annexe 4**)
IV
- Tableau IV:** Résultats de l'identification biochimiques des espèces à partir des prélèvements biologiques (**Annexe 6**) **VI**
- Tableau V :** Répartition des bactéries isolées selon la nature du prélèvement biologiques.
(**Annexe 6**) **VI**
- Tableau VI :** Distribution des profils de résistance (**Annexe 7**) **VII**
- Tableau VII :** Répartition des souches selon la multirésistance. 39
- Tableau VIII :** Répartition des souches MDR/non MDR selon le type de prélèvement 40
- Tableau IX :** Résultats de la recherche de formation du biofilm par les souches d'entérobactéries, selon l'intensité. 43
- Tableau X :** Résultats de la recherche de production d'hémolysine (**Annexe 8**) **VIII**

Sommaire

Résumé	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I. cancer	2
I. 1. Histoire naturelle du cancer	2
I. 2. Altération des défenses immunitaires chez les patients cancéreux	3
II. Cancer et immunodépression	4
II. 1. Neutropénie et neutropénie fébrile	5
II. 2. Déficit de l'immunité humorale	6
II. 3. Déficit de l'immunité cellulaire	6
II. 4. Facteurs liés au risque infectieux chez les cancéreux	6
III. Infections et cancer	7
III. 1. Entérobactéries	9
III. 1. 1. Entérobactéries et résistance aux antibiotiques	10
III. 1. 2. Entérobactéries et virulence	10
III. 2. <i>Pseudomonas</i>	11
III. 2. 1. <i>Pseudomonas</i> et résistance aux antibiotiques	
III. 2. 2. <i>Pseudomonas</i> et virulence	13
III. 3. Staphylocoques	14
III. 3. 1. Staphylocoques et résistance aux antibiotiques	14
III. 2. Staphylocoques et virulence	15
Matériel et méthodes	17
I. Matériel	17
I. 1. Matériel biologique	17
I. 2. Matériel non biologique	17
II. Méthodes	18

II. 2. Mise en culture	18
II. 2. 1. Prélèvements sur écouvillon	18
II. 2. 2. Crachats	18
II. 2. 3. Liquide d'ascite et liquide pleural	18
II. 2. 4. Sang	19
II. 2. 5. Prélèvement sur cathéter	19
II. 2. 6. Urines	19
II. 3. Coloration de Gram	20
II. 4. Identification des Cocci à Gram positif	20
II. 4. 1. Test de la catalase	20
II. 4. 2. Identification des Staphylocoques	21
II. 4. 3. Identification des Streptocoques	21
II. 5. Identification biochimique des bacilles à Gram négatif	21
II. 5. 1. Test d'orientation (Test d'oxydase)	21
II. 5. 2. Identification biochimique par galerie miniaturisées API	22
II. 6. Etude du profil de résistance aux antibiotiques	22
II. 6. 1. Technique de diffusion sur milieu gélosé ou antibiogramme	22
II.6.2. Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Acinetobacter spp</i>	23
II. 7. Recherche des facteurs de virulence des entérobactéries	24
II. 7. 1. Recherche de la capsule polysaccharidique, le phénotype d'hypermucoviscosité et la prodigiosine	24
II. 7. 2. Recherche du pouvoir hémolytique	25
II. 7. 3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain	25
II. 7. 4. Recherche de la formation de Biofilm	26
II. 7. 5. Test de pathogénicité	26
Résultats et discussion	27
I. Epidémiologie :	27
I. 1. Répartition des prélèvements selon la positivité de la culture	27
I. 2. Répartition des prélèvements positifs selon le sexe	27
I. 3. Répartition des prélèvements positifs selon l'âge	28
I. 4. Répartition des prélèvements positifs selon le type de cancer	28

I. 5. Répartition des prélèvements positifs selon la nature	30
I. 6. Répartition des prélèvements positifs selon le traitement anti-cancéreux	31
I. 7. Espèces identifiées	32
II. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques	35
II. 1. Résultats de l'antibiogramme	35
II. 1.1.β lactamines	35
II.1.2.Aminosides	38
II.1.3.Quinolones/Fluoroquinolones	
II.1.4.Tétracyclines, sulfamides et association	39
II. 2. Profils de résistance aux antibiotiques des souches isolées	40
III. Caractérisation phénotypique de la virulence potentielle des entérobactéries	42
III. 1. Recherche des facteurs de virulence communs	42
III. 2. Recherche des facteurs de virulence spécifiques	47
III. 3. Recherche du potentiel de pathogénicité chez <i>S. marcescens</i>	48
IV. Conclusion	51

Le cancer est une maladie multifactorielle et complexe. Il résulte d'altérations génétiques de la cellule perturbant son bon fonctionnement. L'environnement et le patrimoine génétique jouent également un rôle important dans la prédisposition au développement de la maladie. Le cancer est la première cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires, il représente un gigantesque défi pour la médecine mondiale.

L'immunodépression est une des causes majeures de la fragilité du patient cancéreux. Elle est due à différents mécanismes qui peuvent coexister au cours d'un même cancer. Plus fréquentes et/ou plus graves que chez les malades non cancéreux, les infections sont une cause majeure de décès chez les malades atteints de cancer. Ces dernières sont dues à l'intensification des protocoles de chimiothérapie, les traitements lourds que doivent subir les patients à des stades avancés de la néoplasie, ainsi que les nouvelles techniques de greffe de cellules souches hématopoïétiques et les nouveaux immunosuppresseurs.

La survenue d'une complication infectieuse chez un malade porteur d'une hémopathie maligne ou d'une tumeur solide est une urgence diagnostique et thérapeutique. Ces personnes sont sujettes aux différentes infections opportunistes qu'elles soient bactériennes, virales, fongiques ou même parasitaires.

Dans le cadre du projet de fin d'études, nous avons réalisé un travail de recherche concernant les infections bactériennes chez le patient cancéreux. Nous nous sommes fixé deux objectifs principaux. Il s'agit de caractériser sur le plan phénotypique :

- la résistance aux antibiotiques des souches responsables d'infection chez le cancéreux suite à une réalisation d'antibiogrammes par technique de diffusion sur milieu solide
- la virulence potentielle des entérobactéries isolées durant notre étude chez le cancéreux par des tests de facteurs communs : recherche du pouvoir hémolytique, formation du biofilm, effet bactéricide du sérum humain, et des tests de facteurs spécifiques : recherche de la capsule, phénotype d'hypermucoviscosité, et la prodigiosine.

I. Cancer :

Le cancer est la conséquence d'une prolifération incontrôlée d'un clone de cellules eucaryotes, sujettes au renouvellement, et aboutissant à la formation d'une masse tumorale. Cette dernière s'attaque aux tissus sains environnants et peut migrer à distance et coloniser d'autres organes pour former des tumeurs secondaires ou métastases. Le cancer est la première cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires (**Perez-Ponce, 2009 ; Kumar et al., 2017; Ritchie et Roser, 2018**).

Un tiers des décès par cancer sont dus aux 5 principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires : un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool. Le tabagisme est le facteur de risque le plus important ; il est responsable d'environ 22% du total des décès dus au cancer (**Risk Factors Collaborators, 2016**).

I. 1. Histoire naturelle du cancer :

Le cancer est précédé de nombreux processus biologiques et d'états précancéreux évoluant des mois ou des années sans que le patient s'en aperçoive ; la tumeur est non détectable. Au niveau moléculaire, les tumeurs malignes sont le résultat d'une succession, dans une même cellule, de mutations altérant les voies de signalisation régissant les différentes fonctions cellulaires. Ces modifications génétiques acquises confèrent aux cellules des propriétés nouvelles dont l'immortalité, l'autonomie de la division cellulaire et le pouvoir migratoire. L'histoire naturelle du cancer peut être divisée schématiquement en plusieurs étapes illustrées dans la **figure 1** :

- Transformation cancéreuse d'une cellule ;
- Expansion clonale de la cellule cancéreuse ;
- Croissance de la masse tumorale qui devient cliniquement détectable et l'invasion locale avec envahissement locorégional par le tissu cancéreux ;
- Dissémination des cellules cancéreuses à distance du foyer tumoral initial et la formation de foyers tumoraux secondaires (métastases).

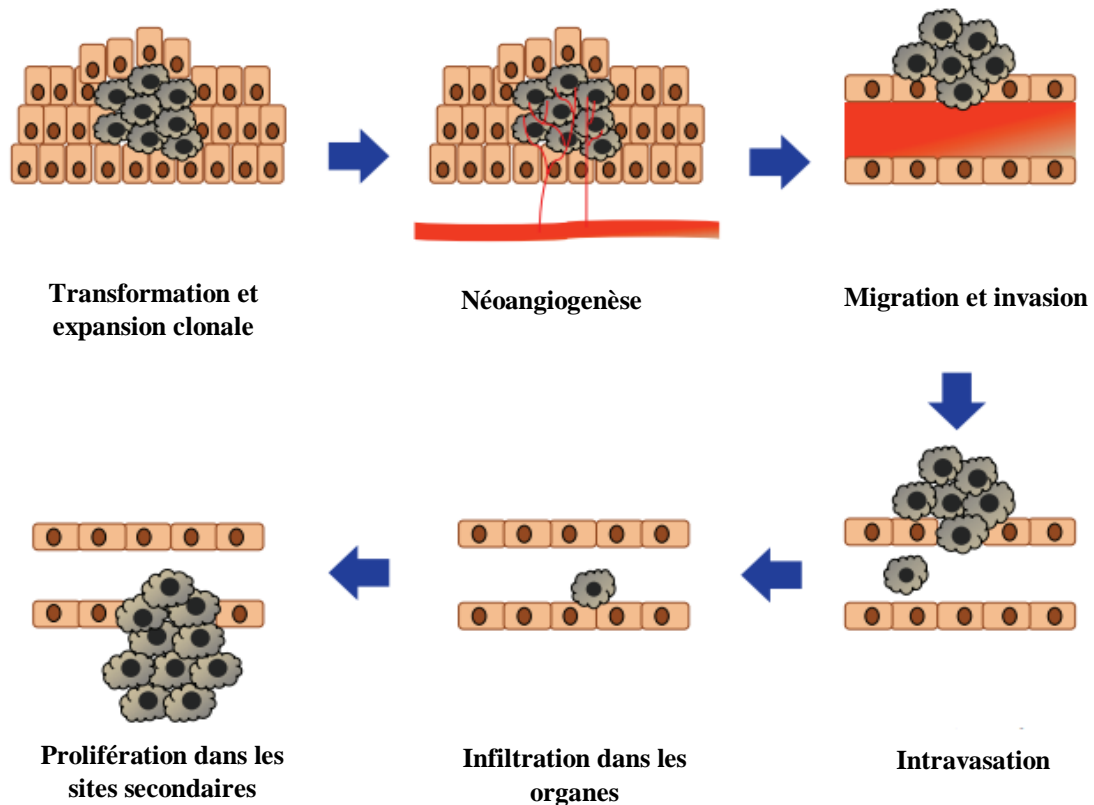


Figure 1 : Etapes de la cancérogénèse et du processus métastatique (Ando et al., 2012)

I. 2. Altération des défenses immunitaires chez les patients cancéreux

Dans un état immunocompétent, le système immunitaire prévient la croissance et la prolifération de cellules cancéreuses en déployant différents mécanismes immunitaires, spécifiques et non spécifiques. Le concept « immunoediting » décrit les interactions du système immunitaire avec la tumeur en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'évasion dont les mécanismes sont illustrés dans la **figure 2** (Owen et al., 2013).

Dans cette figure, nous remarquerons que le développement d'un cancer chez un individu immunocompétent témoigne de l'inefficacité de ses défenses immunitaires naturelles, à entraver le développement tumoral ; c'est l'évasion ou l'échappement tumoral (Owen et al., 2013).

L'affaiblissement du système immunitaire ou « immunodépression » est une conséquence directe au développement et au traitement d'une tumeur. Cet état physiologique est critique car il fragilise et prédispose le cancéreux à de nombreuses maladies notamment les maladies infectieuses. De nombreux facteurs sont la cause de la survenue et l'exacerbation de l'état

d'immunodépression. Ils sont liés, pour la plus part, au traitement anticancéreux que subissent ces patients tels que la chimio et la radiothérapie, la corticothérapie et la splénectomie. Ces traitements modifient en profondeur le fonctionnement du système immunitaire et altèrent fortement les mécanismes de l'immunité innée et adaptative, une réalité constatée par exemple lors du diagnostic d'une neutropénie chez les patients cancéreux.

La neutropénie caractérise souvent le bilan sanguin des patients cancéreux et représente un important facteur de risque aux infections chez ces patients.

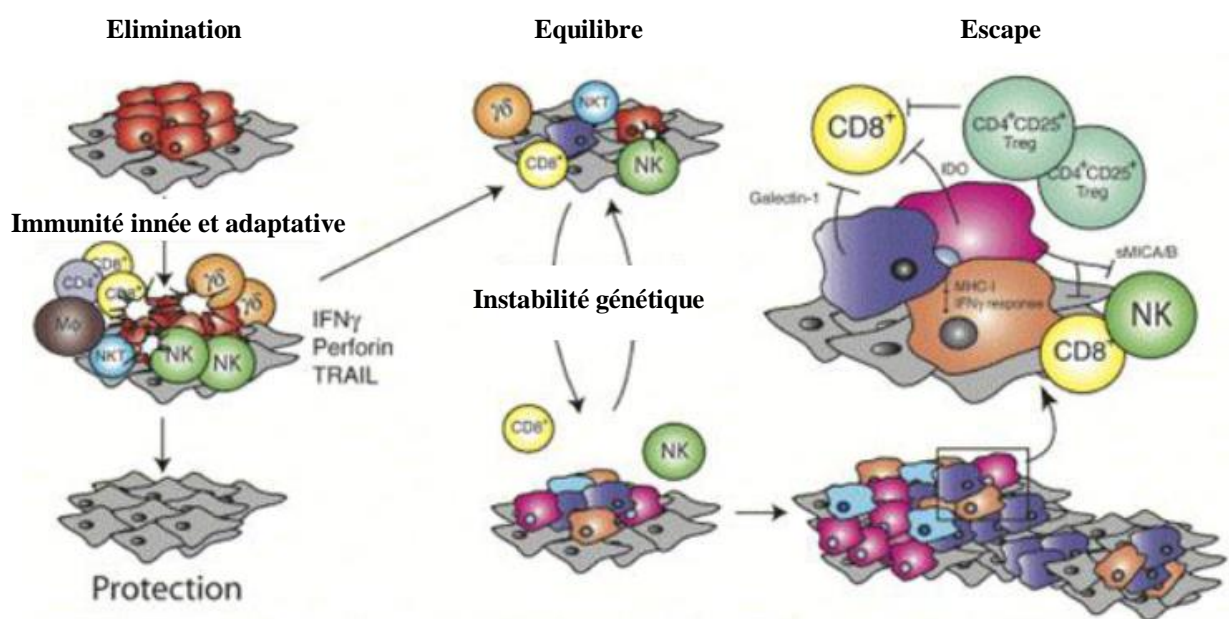


Figure 2 : Phases du processus « Immunoeating » (Dunn et al., 2004).

II. Cancer et immunodépression

L'immunodépression est une déficience immunitaire qui se traduit par une défaillance ou l'absence des acteurs du système immunitaire (notamment des lymphocytes, des phagocytes et du système du complément) ou de leurs fonctions. Ces déficits immunitaires peuvent être soit congénitaux (génétiques) tels que la maladie de Bruton ou acquis comme le SIDA et le cancer (Actor, 2014).

L'immunodéficience se manifeste, dans la majorité des cas, par une susceptibilité élevée aux agents pathogènes. En effet, le risque infectieux est très élevé et les pathologies infectieuses sont caractérisées par leur gravité, leur durée prolongée, la survenue de

complications et de manifestations inhabituelles et aussi par la faible pathogénicité de l'agent causal (**Actor, 2014**).

Les infections sont une cause majeure de décès chez les malades des services d'oncologie. La survenue d'une complication infectieuse chez les cancéreux est donc une urgence diagnostique et thérapeutique. La survenue, la présentation clinique, le pronostic ainsi que le type d'infections sont dépendants du type d'immunodépression lié à la maladie tumorale et au traitement, engendrant souvent une neutropénie et/ou un déficit humoral ou cellulaire (**Blot, 2003**).

II. 1. Neutropénie et neutropénie fébrile

La neutropénie, caractérisée par un taux anormalement bas des granulocytes neutrophiles dans le sang, est la plus fréquente des toxicités hématologiques liées à la chimiothérapie anti-cancéreuse. Elle est nommée CIN pour « Chemotherapy-induced neutropenia ». La neutropénie fébrile se définit par une fièvre (Au-delà de 38.5°C) et une importante neutropénie (**Goyette, 2012 ; Ma et al., 20016**).

Une neutropénie est dite sévère lorsque le taux de neutrophiles en circulation est inférieur à $0,5 \times 10^9/l$. Les infections les plus graves surviennent souvent quand la neutropénie est dite profonde ($0,1 \times 10^9/l$). L'intensité et la durée de la neutropénie constituent les facteurs de risque d'infection les plus grands chez le patient en chimiothérapie (**Freifeld et al., 2010 ; Goyette, 2012**).

La chimiothérapie des tumeurs solides entraîne des neutropénies de courte durée (3-7 jours), le plus souvent entre le 8^{ème} et le 16^{ème} jour après la chimiothérapie. L'incidence et la gravité des neutropénies fébriles s'accroissent lors du traitement d'un myélome multiple ou d'un lymphome ou encore lors d'une greffe de moelle autologue. Le risque est maximal en cas de leucémie aiguë et de greffe de moelle allogène. Le risque d'infections, particulièrement d'origine fongique, est alors plus important (**National Comprehensive Cancer Network, 2011**).

Même si une infection n'est prouvée que chez environ 30 % des patients arrivant à l'urgence en neutropénie fébrile, certains feront un sepsis sévère et mourront rapidement. Par conséquent, toute fièvre supérieure à 38 °C chez un patient neutropénique est une urgence thérapeutique du fait du risque de choc septique (**Pizzo, 1993 ; Chandesris et al., 2007**).

II. 2. Déficit de l'immunité humorale

Les déficits de l'immunité humorale sont liés à une atteinte des immunoglobulines produites par les lymphocytes B particulièrement dans le cas :

- ✓ d'hémopathies touchant les lymphocytes B (leucémie lymphoïde chronique, maladie de Waldenström) ou les plasmocytes (myélome) (**Blot ,2003**).
- ✓ d'allogreffes de moelle osseuse par défaut, retard de reconstitution du répertoire B (**Chandesris et al., 2007**).
- ✓ d'asplénisme anatomique ou fonctionnel (**Blot ,2003**).

La principale conséquence des déficits en anticorps est la survenue d'infections par des bactéries à multiplication extracellulaire encapsulées, tout particulièrement les espèces *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. Ces infections sont récidivantes et touchent principalement la sphère oto-rhino-laryngée (ORL) et les voies aériennes supérieures et inférieures. Une fréquence non négligeable des infections digestives à entérobactéries (*Salmonella, Campylobacter, Shigella*) sont aussi observées. Ces infections peuvent mettre en jeu le pronostic vital en cas de dissémination septicémique ou d'atteinte méningée (**Chandesris et al., 2007**).

II. 3. Déficit de l'immunité cellulaire

Les déficits de l'immunité cellulaire, médiée par les lymphocytes T, entraînent des infections sévères potentiellement mortelles principalement virales et parasitaires. Des infections fongiques et infections à bactéries intracellulaires sont aussi mentionnées dans la littérature (**Chandesris et al., 2007**).

II. 4. Facteurs liés au risque infectieux chez les cancéreux

La neutropénie et le déficit en immunité humorale et cellulaires, souvent diagnostiqués chez les patients atteints de cancer, sont favorisés par plusieurs facteurs (**Tableau I**) et qui sont liés aux :

- ✓ types de cancer
- ✓ traitements anti-cancéreux (chirurgie, chimio, radio, cortico et immunothérapie)
- ✓ allogreffes
- ✓ carences nutritionnelles

Tableau I : Facteurs liés au risque infectieux chez les cancéreux (Horowitz et al., 1990 ; Shronts, 1993 ; Leke et al., 1996 ; Mangram et al., 1999 ; Potter, 1999 ; Claudette et Varricchio, 2004 ; Crawford et al., 2004 ; Labourey et al., 2004 ; Chandesris et al., 2007 ; Di Sabatino et al., 2011).

Facteur de risque	Conséquences
Cancer	Altération de l'hématopoïèse
Chimiothérapie	Myélosuppression et effets cytotoxiques sur l'épithélium intestinal
Radiothérapie	Myélosuppression lorsque le champ irradié concerne le squelette
Immunothérapie	Déplétion lymphocytaire profonde
Corticothérapie	Inhibition de l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires
Allogreffe	Réaction du greffon contre l'hôte
Chirurgie	Infections causées par des germes endogènes (Flores cutanéomuqueuse) ou exogènes (Instruments, personnels...)
Splénectomie	
Carences nutritionnelles	Affaiblissement des défenses immunes
Cathéter	Attachement des bactéries des milieux hospitaliers sur les surfaces abiotique et formation de biofilm

III. Infections et cancer

Un patient cancéreux qui présente des déficiences immunitaires est susceptible de contracter une infection et peut mourir en quelques heures, si la prise en charge n'est pas rapide et adéquate.

Les infections peuvent être causées par des cocci à Gram positif (ex. : staphylocoque, pneumocoque, entérocoque), des bacilles à Gram négatif (ex. : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) ou des champignons (levures comme *Candida albicans* ou moisissures comme *Aspergillus*). Les microorganismes responsables de l'infection, colonisent déjà le patient dans la majorité des cas, on parle alors de « pathogènes opportunistes ». En effet, la chimiothérapie provoque l'inflammation de l'ensemble des muqueuses (des gencives jusqu'à l'anus), favorisant l'entrée dans la circulation de bactéries et de levures présentes dans le tube digestif (**National Comprehensive Cancer Network, 2011 ; Goyette, 2012**).

L'administration d'une chimiothérapie nécessite souvent la mise en place d'une voie centrale en raison d'un accès veineux difficile, ou de l'utilisation d'une perfusion prolongée à domicile. Ces corps étrangers sont autant de surfaces sur lesquelles peuvent se développer des biofilms bactériens fortement résistants.

Parmi les pathologies infectieuses survenant chez les patients des services d'oncologie, les infections respiratoires sont les plus fréquentes ; elles sont associées à la mortalité la plus élevée chez l'immunodéprimé, en particulier après greffe de cellules souches hématopoïétiques (**Blot, 2003 ; Thomblyn et al., 2009**).

Les infections du système nerveux central sont relativement rares en oncologie. Elles sont en revanche souvent plus sévères que chez l'immunocompétent, avec une mortalité élevée (**Blot, 2003**). Les infections liées aux cathéters concernent environ 5 % des cathéters veineux centraux en oncologie, contre 30 % chez les patients VIH positifs (**Astagneau et al., 1999**).

Les tumeurs solides entraînent des complications mécaniques par obstruction tumorale, bronchique ou digestive, ou par perforation/rupture (péritonite ou pyopneumothorax). Elles se compliquent fréquemment par des infections urinaires ou du site opératoire (**Leclercq et al., 1998**).

En plus des germes liés à la flore commensale, le patient cancéreux peut contracter une infection dite nosocomiale. En effet, L'immunodéprimé admis à l'hôpital peut devenir rapidement colonisé par la flore nosocomiale hospitalière, dont les germes sont particulièrement résistants aux antibiotiques et/ou virulents (**Goyette, 2012 ; El Fertas-Aissani, 2013**).

Dans le **tableau II**, sont résumés les principaux germes incriminés dans les infections chez les patients cancéreux immunodéprimés. Dans ce qui suit nous allons décrire, brièvement, 3 exemples de groupes bactériens pathogènes ou pathogènes opportunistes décrits, souvent, dans les pathologies infectieuses du cancéreux.

Tableau II : Principaux germes incriminés dans les infections chez les cancéreux.

Bactéries	Pathogènes habituels
Bactéries à Gram négatif (Entérobactéries)	<i>Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Morganella, Serratia, Salmonella</i>
Bactéries à Gram négatif (Aérobies stricts)	<i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas, Acinetobacter</i>
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus, Streptococcus, Enterococcus, Corynebacterium, Listeria</i>
Bactéries à Gram positif (Anaérobies)	Anaérobies : <i>Clostridium, Bacteroides</i>
Autres	<i>Mycobacterium</i>

(Chadesris *et al.*, 2007)

III. 1. Entérobactéries :

Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bactéries à Gram négatif, non sporulés et anaérobies facultatifs. Ils sont oxydase négative, catalase positive, fermentent le glucose et réduisent les nitrates en nitrites. Dans cette famille sont retrouvées des espèces d'importance médicale tels que : *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis* (Donnenberg, 2015 ; Limeres, 2017).

Les entérobactéries sont aussi bien retrouvées dans l'environnement (sol, eaux de surface...) que chez l'homme. En effet, nombreux des membres de cette famille sont des composants essentiels de la flore intestinale et nasopharyngée, entreprenant diverses interactions avec leur hôte ; ils peuvent donc être commensaux, pathogènes opportunistes ou

pathogènes strictes. Les espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* peuvent causer diverses infections, qu'elles soient nosocomiales ou communautaires, allant de la bactériémie à l'endocardite, en passant par les infections des voies respiratoires, de la peau, des tissus mous et des voies urinaires (**Donnenberg, 2015**).

III. 1. 1. Entérobactéries et résistance aux antibiotiques :

Les infections causées par les entérobactéries sont principalement traitées par les β -lactamines qui sont souvent associés aux aminosides et aux fluoroquinolones. La résistance des entérobactéries aux antibiotiques, en particulier aux β -lactamines, est retrouvée naturellement chez certaines espèces. Cette résistance est codée par des gènes chromosomiques, stables et transmissibles verticalement. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante aux amino-pénicillines par production d'une pénicillinase chromosomique à spectre étroit (SHV-1) exprimée de façon constitutive (**Paterson et Bonomo, 2005 ; Livemore, 2008**).

Une utilisation inadéquate et continue de molécules antibiotiques a généré une forte pression de sélection sur les entérobactéries. Ceci a eu pour conséquence la sélection et l'expansion de clones multirésistants, ayant acquis de nouveaux profils de résistance par le biais de transferts horizontaux de gènes de résistance. Tel est le cas des souches dites « BLSEs » ou souches productrices de β -lactamases à spectre élargi, des enzymes, hydrolysant les céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime...), s'étant largement répandue parmi les entérobactéries. Une pandémie alarmante est observée depuis plus d'une décennie de ce profil de résistance, limitant ainsi les options thérapeutiques et obligeant le clinicien à avoir recours aux molécules de réserve (**Iredell et al., 2016 ; Navon-Venezia et al., 2017**).

III. 1. 2. Entérobactéries et virulence :

Les facteurs de virulence sont exprimés par les bactéries dans un environnement hostile où elles doivent survivre et se multiplier. Ces facteurs sont essentiels à l'établissement des différentes phases de l'infection, que nous pouvons résumer dans l'entrée, la colonisation, l'échappement aux mécanismes de défenses de l'hôte et l'induction des effets délétères sur les tissus. Les membres de la famille des entérobactéries partagent plusieurs facteurs de virulence tels que la capsule polysaccharidique, le LPS, les adhésines, les sidérophores, les toxines et la formation de biofilm. Ceux qui sont exprimés par l'espèce type de cette famille, à savoir *E. coli*, sont illustrés dans la **figure 3**.

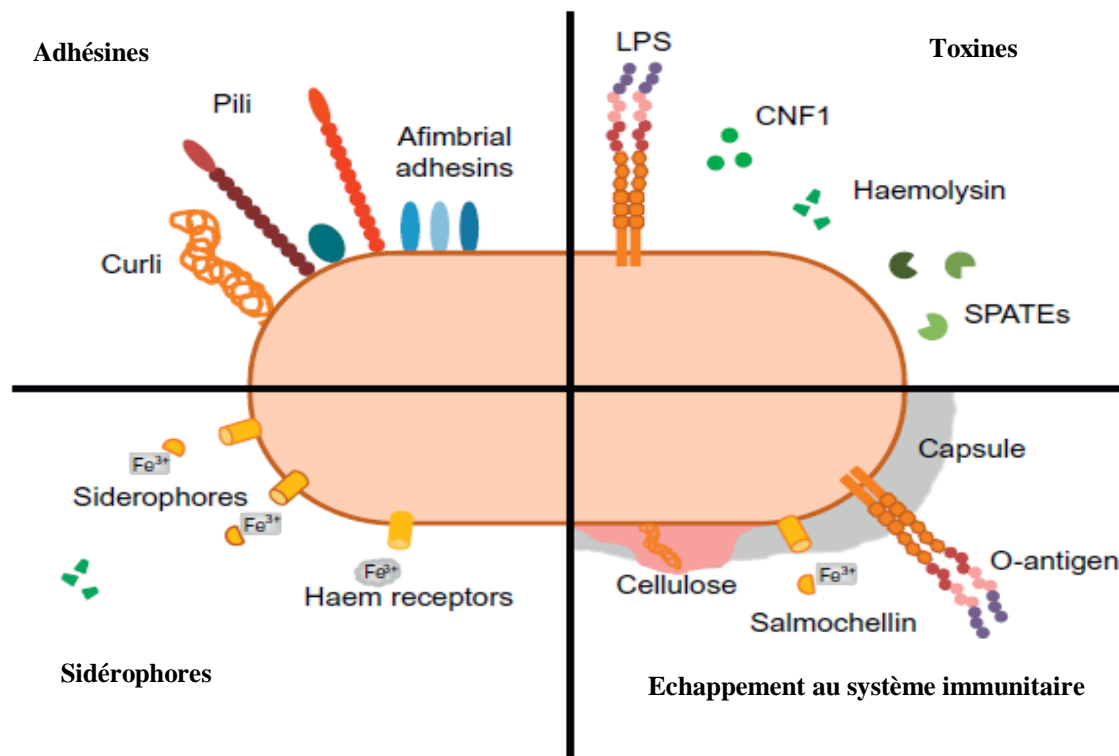


Figure 3 : Facteurs de virulence exprimés par les souches pathogènes d' *E. coli* (Lüthje et Brauner, 2014).

III. 2. *Pseudomonas* :

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces bactériennes d'intérêt médical et biotechnologique, retrouvées aussi bien dans l'environnement (sol, eaux, plantes...) qu'en étroite interaction avec l'organisme humain. Il s'agit de bacilles Gram négatif non fermentaires, non sporulés, aérobies strictes, oxydase positive. Il existe des espèces pathogènes pour les plantes ainsi que pour les animaux dont l'homme. En effet, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont souvent impliquées dans des infections nosocomiales d'origine exogène (manu portées, sur matériel médical...) ou endogène (immunodéprimés) (Palleroni, 2005 ; Özen et Ussery, 2012).

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type. C'est une bactérie à extrémité effilée ou arrondie, très mobile grâce à une ciliature polaire, non exigeante et peut se développer sur des

milieux de culture ordinaire en dégageant une odeur caractéristique. *Pseudomonas aeruginosa* peut produire un pigment bleu vert la pyocyanine ou pyoverdine, la propriété qui lui vaut l'appellation « bacille pyocyanique ». Elle peut être à l'origine de nombreuses infections particulièrement chez les individus immunodéprimés (**Palleroni, 2005**). La résistance et la virulence de cette espèce type seront traitées dans ce qui suit.

III. 2. 1. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques :

Pseudomonas aeruginosa est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et par sa rapidité d'acquisition de nouveaux traits de résistance aux antibiotiques. En effet, elle présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre limité et sont représentées par certaines β -lactamines (pipéracilline et ticarcilline, avec ou sans inhibiteur, ceftazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine), les aminosides (sauf la kanamycine), la fosfomycine et la colimycine (**Mérens et al., 2011**)

P. aeruginosa possède naturellement des mécanismes lui permettant de résister à de nombreux antibiotiques. Cette résistance intrinsèque résulte de l'action combinée de plusieurs mécanismes, potentialisés par la très faible perméabilité de la membrane externe. En limitant la vitesse de pénétration intracellulaire des antibiotiques, cette membrane favorise l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices, ou de systèmes d'efflux (**Nikaido, 1986 ; Mérens et al., 2011**). Cette espèce est naturellement résistante à plusieurs aminosides dont la kanamycine en raison de la production d'une phosphotransférase APH(3')-IIb (**Hachler et al., 1996**). Par ailleurs, presque toutes les souches de *P. aeruginosa* produisent une β -lactamase à large spectre, AmpC, qui est une enzyme de la classe C d'Ambler. Elle hydrolyse rapidement les aminopénicillines, les céphalosporines de première (C1G) et de deuxième (C2G) génération (**Livermore, 1995**).

L'émergence de mutants résistants sous traitement est fréquemment constatée dans les infections à *P. aeruginosa*. Parfois, l'expression de ces mécanismes ne dépend pas de mutations mais s'intègre dans un phénomène adaptatif, complexe et transitoire, conditionné par un mode de vie particulier comme le biofilm. La formation de communautés bactériennes denses (biofilm) modifie en effet, le comportement individuel des cellules, les rendant souvent beaucoup plus résistantes aux antibiotiques qu'elles ne le sont à l'état isolé (planctonique). Les nouvelles résistances de *P. aeruginosa* sont fréquemment liées à

l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon et intégron) (Mérens et al., 2011).

III. 2. 2. *Pseudomonas* et virulence :

Depuis plus de soixante ans, le bacille pyocyanique fascine et reste à bien des égards une énigme pour les chercheurs qui s'intéressent à sa virulence. Rarement pathogène chez l'individu sain, ce bacille de l'environnement constitue pourtant une cause majeure d'infections nosocomiales dans de nombreux pays. De la simple colonisation à l'infection invasive, la bactérie exprime une pathogénicité polymorphe qui dépend avant tout de l'état immunitaire, de l'intégrité des barrières cutané-muqueuses et de l'efficacité des mécanismes de clairance des patients. Il en résulte de nombreuses infections siégeant au niveau de l'arbre urinaire, du tractus respiratoire, de la peau et des muqueuses, pouvant se compliquer parfois d'une bactériémie avec ou sans localisations secondaires (os, méninges, endocardie...) (Bentzmann et Plésiat, 2011).

La propriété de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* va de paire avec la production d'un nombre impressionnant d'attributs cellulaires et de facteurs solubles permettant la colonisation des surfaces épithéliales et la dégradation des tissus. Tous ces éléments concourent à la pathogénicité par des actions complémentaires. La pathogénicité du bacille pyocyanique est donc multifactorielle ; c'est un édifice complexe composé d'un ensemble de facteurs de virulence dont l'expression individuelle et probablement le rôle varient au cours de l'infection et selon les hôtes (Figure 4) (Bentzmann et Plésiat, 2011).

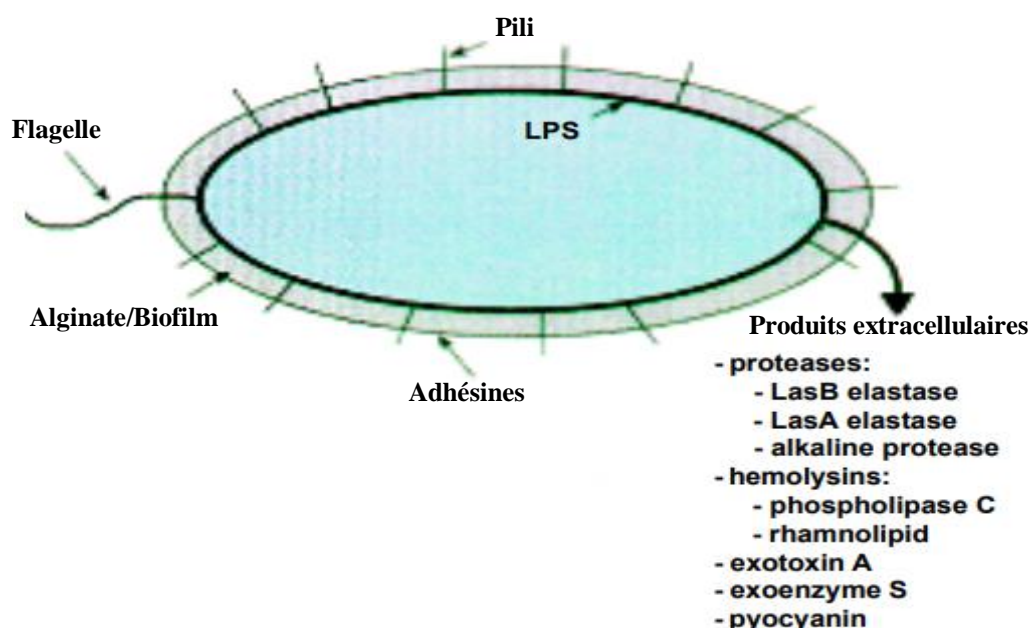


Figure 4 : Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (Van Delden et Iglewski, 1998)

III. 3. Staphylocoques :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif. Ce sont des agents pathogènes de nombreux mammifères y compris l'homme. Traditionnellement, les membres de ce genre sont subdivisés en deux groupes en fonction de leur capacité à coaguler le plasma sanguin (réaction à la coagulase). Le groupe des staphylocoques à coagulase positive comprend l'espèce la plus pathogène à savoir *S. aureus* ou « staphylocoque doré ». Le groupe des staphylocoques à coagulase négative ou « SCN » comprend plus de 30 espèces qui sont, pour la plus part, des commensaux de la peau tels que *S. epidermidis* (**Foster, 1996 ; Peacock et al., 2001**).

Les staphylocoques font entre 0,5 et 1,0 μm de diamètre, poussent en grappes, en paires et parfois en chaînes courtes. La configuration des cocci permet de distinguer les microcoques et les staphylocoques des streptocoques, qui se développent généralement en chaîne (**Foster, 1996**).

Staphylococcus aureus occupe encore aujourd'hui, de par sa virulence et sa résistance aux antibiotiques usuels, une grande importance en pathologie humaine. Cette bactérie est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Les fosses nasales antérieures constituent, avec les zones humides de la peau (aisselles, poignets, périnée), le site réservoir essentiel de *S. aureus*. Dans la population générale, la prévalence du portage nasal permanent est comprise entre 20 et 25 % tandis que la colonisation transitoire par cette bactérie affecte au moins 60 % de la population restante (**Peacock et al., 2001 ; Vincenot et al., 2008**).

III. 3. 1. Staphylocoques et résistance aux antibiotiques :

Avant la découverte du premier antibiotique, par Alexandre Fleming, les infections invasives à *S. aureus* étaient souvent fatales. La découverte de la pénicilline a eu un effet spectaculaire sur le pronostic de ces infections. Toutefois, les premières souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline ont été décrites dès 1942, d'abord en milieu hospitalier puis dans la communauté. Cette résistance est liée à la production d'une pénicillinase codée par le gène *blaZ* situé sur un plasmide (**Kirby, 1944 dans Tattevin, 2011 ; Parsonnet et al., 2001 ; Lowy, 2003**). En 1960, la mise au point d'une pénicilline semi-synthétique résistante à cette pénicillinase, la « méticilline », a permis de contourner cette résistance, avec un antibiotique à

spectre étroit, rapidement bactéricide et bien toléré. L'arsenal thérapeutique vis-à-vis de ces *S. aureus* résistants à la pénicilline va par la suite s'étoffer au sein même des β -lactamines, avec le développement des céphalosporines et des inhibiteurs de β -lactamases (Tattevin, 2011).

Dès 1961, les premières souches cliniques de *S. aureus* résistantes à la méticilline appelées aussi « SARM » sont observées. Cette résistance est liée à la synthèse d'une protéine de liaison à la pénicilline, la PLP2a, qui entraîne une résistance à l'ensemble des β -lactamines. PLP2a intervient dans la dernière étape de synthèse du peptidoglycane ou la transpeptidation. Elle n'a qu'une faible affinité pour les β -lactamines et permet la poursuite de la synthèse de la paroi bactérienne, même lorsque les quatre PLP classiques (1, 2, 3 et 4) sont inactivées par les β -lactamines. PLP2a est codée par le gène *mec*, localisé sur un élément génétique mobile chromosomique, appelé « staphylococcal cassette chromosome *mec*, », ou « *SCCmec* », bordé, à ses deux extrémités, par des gènes appelés cassette chromosome recombinase (*ccRA/ccRB* ou *ccRC*), qui permettent la transmission horizontale inter- et intra-espèce de *SCCmec* (Katayama *et al.*, 2000 ; Tenover, 2004).

Contrairement à la résistance à la pénicilline, l'impact de la résistance à la méticilline est majeur. En effet, la vancomycine, antibiotique de référence du traitement des infections à SARM, ne présente pas la cinétique de bactéricidie rapide et la maniabilité par lesquelles se caractérisent les β -lactamines. La moindre efficacité intrinsèque de la vancomycine par rapport aux β -lactamines, documentée pour les infections à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM), a probablement un impact sur le pronostic des infections à SARM, plus souvent fatales que les infections à SASM, même si des facteurs confondants interviennent (Cosgrove *et al.*, 2003 ; Cosgrove *et al.*, 2005 ; Stryjewski *et al.*, 2007).

III. 2. Staphylocoques et virulence :

L'espèce type du genre *Staphylococcus*, à savoir *Staphylococcus aureus*, colonise un quart à un tiers de la population en bonne santé et possède un arsenal impressionnant de facteurs de virulence. Cette bactérie possède un ingénieux système de régulation appelé « accessory gene regulator » ou « *agr* », qui lui permet d'adapter sa synthèse protéique à ses besoins, avec une expression préférentielle des gènes assurant son adhésion et sa persistance au contact des cellules de l'hôte au stade de colonisation (adhésines, protéine A), et une expression préférentielle des gènes contribuant à son extension locorégionale et à sa dissémination au stade d'infection (exo-enzymes, toxines). Ce switch moléculaire est assurée par le phénomène

du « quorum sensing » (Diep et Otto, 2008 ; Miller et Diep, 2008, Tattevin, 2010). Dans la **figure 5** sont résumés les principaux facteurs de virulence retrouvés chez cette espèce.

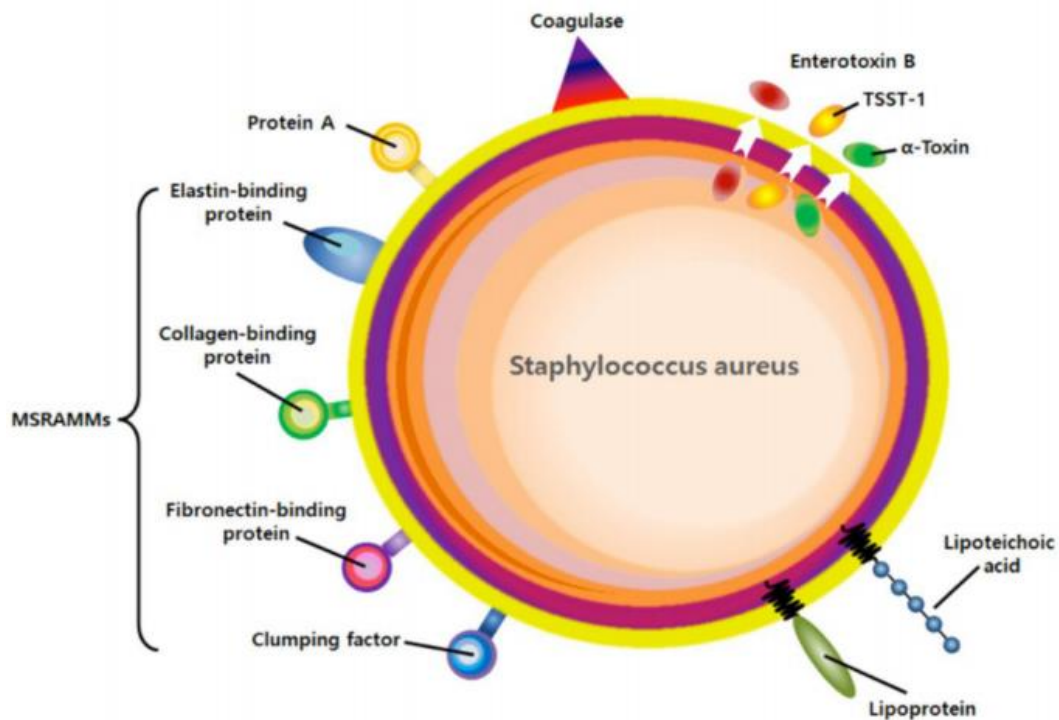


Figure 5 : Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Choi et al., 2014).

Notre travail a concerné la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence potentielle de souches bactériennes à l'origine d'infections chez les patients cancéreux.

Cette étude a été réalisée au niveau de l'unité de bactériologie du CHU Frantz Fanon de Blida, du laboratoire pédagogique l'USDB et du laboratoire de Génétique de l'USTHB pendant une durée de 4 mois allant du mois de février au mois de mai 2019.

Les profils de résistance aux antibiotiques et de virulence, des souches identifiées, ont été obtenus après avoir réalisé les étapes de la démarche suivante :

- Identification biochimique
- Analyse phénotypique de la résistance aux antibiotiques
- Recherche des facteurs de virulence

Remarque : Seules les entérobactéries ont fait l'objet de la recherche des facteurs de virulence.

I. Matériel :

I. 1. Matériel biologique :

Les souches objets de notre étude, ont été isolées à partir des prélèvements biologiques de patients atteints de cancer et suivis au niveau du même CHU. Les données cliniques et thérapeutiques des patients ont été enregistrées et consignées dans un fichier Excel.

Les prélèvements étaient de différentes origines : du sang (n=55), des prélèvements de cathéter (n=6) associés à des prélèvements sanguins, et du pus (n=47), des prélèvements buccaux (n=19), annaux (n=19) et nasaux (n=18), urines (n=14), pulmonaires (n=13), du liquide d'ascite (n=7), et génitaux (n=5).

La recherche du pouvoir hémolytique et de la sensibilité au système du complément a nécessité l'utilisation de sang et de sérum humain respectivement. La préparation de ces composants biologiques est détaillée dans la section **II. 7. 2** et **II. 7. 3**.

I. 2. Matériel non biologique :

Nous avons utilisé de la verrerie, de l'appareillage, des milieux de culture, des réactifs, des galeries miniaturisées API et des disques chargés d'antibiotiques. Leurs caractéristiques sont résumées dans **l'annexe 1**.

II. Méthodes :

II.1 Examen macro et microscopique :

Tout prélèvement reçu au laboratoire doit subir un examen macroscopique et microscopique avant la mise en culture (**Annexe 2**).

II. 2. Mise en culture

La culture est l'examen de référence pour le diagnostic. Elle permet d'affirmer le diagnostic, identifier l'agent étiologique et étudier la sensibilité aux antibiotiques. Elle est effectuée sur des milieux gélosés.

II. 2. 1. Prélèvements sur écouvillon :

Les prélèvements sur écouvillon sont nombreux, allant du pus aux prélèvements anaux, nasaux et génitaux. La mise en culture se fait par déchargement d'écouvillon après son humidification en ajoutant du bouillon d'enrichissement (BHIB ou BGT). L'ensemencement est réalisé sur une boîte de BCP (ou Hektoen) et de GSC, par la technique des 4 quadrants. Une boîte de GSF est ajoutée pour les prélèvements de gorge et les prélèvements buccaux et vaginaux et une boîte de GN pour les prélèvements anaux. Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h et sous une atmosphère riche en CO₂ GSC et GSF. Une culture est dite positive, si elle présente de nombreuses colonies bactériennes.

II. 2. 2. Crachats :

L'examen cytotabériologique d'un crachat reçu dans un récipient stérile peut aider à faire un diagnostic microbiologique d'infection respiratoire des voies inférieures. 10µl de crachat sontensemencés sur une boîte de GSC, une boîte de GSF et une boîte de gélose BCP (ou Hektoen) par la technique des 4 quadrants. Il s'en suit une incubation à 37°C pendant 24 à 48h et sous une atmosphère riche en CO₂ GSC et GSF.

Une culture est dite positive si une concentration importante de bactéries est présente dans le 3^{ème} et 4^{ème} quadrant.

II. 2. 3. Liquide d'ascite et liquide pleural :

L'ensemencement de ce genre de prélèvement en utilisant une pipette Pasteur, par la technique des 4 quadrants, est réalisée sous un poste de sécurité microbiologique, en déposant deux gouttes du liquide dans une boîte de GSC et BCP (ou Hektoen). Des bouillons BHIB et BGT sont aussiensemencés.

Une culture est dite positive, si elle présente de nombreuses colonies bactériennes, et un trouble dans le bouillon.

II. 2. 4. Sang :

L'hémoculture consiste à mettre en culture du sang circulant qui est normalement stérile, afin de pouvoir rapidement détecter et identifier l'agent infectieux responsable d'une bactériémie. La manipulation de ce genre de prélèvement est réalisée sous un poste de sécurité microbiologique. Généralement deux flacons sont ensemencés ; un flacon aérobie et un flacon anaérobie.

L'ensemencement peut se faire sur deux types de flacons de milieux de culture selon la disponibilité : des flacons pour les systèmes manuels, et des flacons pour les systèmes automatisés (**Annexe 2**). L'incubation des flacons à environ 35°C pendant 7 jours est suffisante. Elle peut être réduite à 5 jours avec les automates.

Les géloses BCP et GSC sont ensemencées par l'équivalent de 100ul de sang, puis incubées à 35°C pendant 24h, et dans une atmosphère enrichie en CO₂ pendant 24-48h pour GSC.

Après le délai d'incubation, les colonies obtenues doivent faire l'objet d'identification par des tests d'orientation ainsi que les galeries miniaturisées API afin de détecter les germes impliqués en bactériémies.

II. 2. 5. Prélèvement sur cathéter :

La mise en culture se fait selon la méthode de Cleri simplifiée dite méthode de « Brun Buisson ». Le cathéter reçu est additionné de 1ml d'eau physiologique stérile, et la suspension obtenue est ensemencée sur boîtes BCP (4 quadrants) et GSC (étalement).

Un dénombrement des colonies est réalisé pour la boîte ensemencée par râteau. Une culture est dite positive, si le nombre de colonies atteint le seuil de 100 UFC.

II. 2. 6. Urines :

La mise en culture des urines, recueillies stérilement se fait en suivant une méthode de référence ; la méthode de KAAS.

0.1 ml d'urine homogénéisée est diluée dans 9.9 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette calibrée à 0.1 ml ; puis 0.1 ml de cette dilution est aussitôt étalée sur une GN et GSC

avec un râteau préalablement stérilisé. L'urine non diluée est ensemencée en parallèle sur un milieu sélectif (BCP).

Les boîtes GN et BCP sont incubées à 37°C pendant 24h, et dans une atmosphère riche en CO₂ pendant 24h pour la boîte GSC. Après incubation, un dénombrement est réalisé selon la formule suivante : $N = n * D * 10$ où :

- N : nombre de germes présent par ml d'urine
- n : nombre de colonies visibles sur la boîte ensemencée
- D : l'inverse de la dilution 10²
- 10 : l'inverse de l'inoculum déposé à la surface de la boîte

L'interprétation du dénombrement est mentionnée dans le tableau en **annexe 2**.

II. 3. Coloration de Gram :

La coloration de Gram permet de classer les bactéries dans deux groupes, selon l'affinité de leur paroi pour les colorants. Nous distinguerons les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Cette coloration permet une meilleure appréciation de l'aspect morphologique des bactéries et leur mode de regroupement. Le protocole de coloration est détaillé en **annexe 2**.

II. 4. Identification des Cocci à Gram positif :

Les caractères d'identification des bactéries sont essentiellement biochimiques. Des tests d'orientation sont réalisés pour identifier les germes impliqués. Des galeries classiques ou miniaturisées sont généralement utilisées permettant l'étude simultanée de plusieurs caractères biochimiques.

II. 4. 1. Test de la catalase :

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram positif. La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries. Le test se fait comme suit :

Sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée est déposée et mélangée à une colonie prélevée sur boîte. L'apparition de bulles et le dégagement gazeux de dioxygène correspond au résultat « catalase positive » et indique les *staphylococcus* sp. La catalase négative indique les *streptococcus* sp.

II. 4. 2. Identification des Staphylocoques :

➤ **Recherche de la coagulase :**

La mise en évidence de la coagulase nous permet d'identifier les *Staphylococcus aureus*. La coagulase est une enzyme capable de coaguler le plasma humain par transformation du fibrinogène en fibrine. Le protocole est le suivant :

Dans un tube à essai stérile, mélanger 500µl de plasma humain à quelques colonies. L'incubation se fait à 37°C pendant 2 à 4 heures. La prise en masse de 2 /3 du mélange traduit une coagulation de plasma humain, cela indique qu'il s'agit d'un *Staphylococcus aureus*.

➤ **Test de Pastorex :**

PASTOREX-STAPH-PLUS est un test rapide d'agglutination entre le fibrinogène, la protéine A et des polysaccharides capsulaires, présents uniquement chez *Staphylococcus aureus*. Le test se fait comme suit :

Dans un cercle de la carte d'agglutination, mélanger une goutte de réactif latex test à des colonies de cocci Gram positives et catalase positive. Procéder de la même manière, concernant le réactif latex témoin négatif mais sur un autre cercle. Homogénéiser et agiter par un mouvement de lente rotation. La réaction positive se traduit par la formation d'agrégats avec seulement le latex test, visible à l'œil nu ; il s'agit de *Staphylococcus aureus*. Si l'on ne note pas d'agrégats avec les deux réactifs (latex test et latex témoin négatif) ceci indique la présence de *Staphylococcus sp.*

II. 4. 3. Identification des Streptocoques :

L'identification des streptocoques repose sur la nature de l'hémolyse (β , α) autour des colonies isolées sur gélose Columbia au sang, et sur la détection des antigènes polysaccharidiques présents dans la paroi cellulaire et spécifiques du groupe streptococcique. Les différents tests permettant l'identification des streptocoques sont résumés dans l'annexe 3.

II. 5. Identification biochimique des bacilles à Gram négatif :

II. 5. 1. Test d'orientation (Test d'oxydase) :

Le cytochrome oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative. Il agit sur le substrat «N-diméthyle para-phénylène-diamine» et entraîne la formation d'une semi-quinone rouge, cette dernière très instable, s'oxyde rapidement donnant un composé violet. La recherche de l'enzyme se fait comme suit :

Sur une lame de verre propre, déposer un disque pré-imprégné de N-diméthyle para-phénylène-diamine et trempé préalablement dans l'eau distillée. Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie puis la déposer sur le disque.

Une réaction positive se traduit par le virage immédiat au violet foncé (Exemple : *Pseudomonas*). Si le disque reste blanc ceci correspond à une réaction négative (Entérobactéries)

II. 5. 2. Identification biochimique par galerie miniaturisées API :

➤ **API 20E :**

API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae*, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland préparée dans de l'eau distillée stérile. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Annexe 3**). Après une incubation à 37°C pendant 24h et ajout de réactifs à certains tests, la lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Annexe 3**).

➤ **API 20 NE :**

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne saline, préparée dans du NaCl 0.85%, en respectant les mentions sous chaque microtube (**Annexe 3**). Après une incubation à 37°C pendant 24h, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture, après ajout de réactifs à certains tests. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (**Annexe 3**).

Les protocoles d'utilisation des galeries d'identification des staphylocoques et des streptocoques sont mentionnés dans l'**annexe 3**.

II. 6. Etude du profil de résistance aux antibiotiques :

II. 6. 1. Technique de diffusion sur milieu gélosé ou antibiogramme :

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes. Le principe de cette méthode consiste à tester la sensibilité d'une souche bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Cette méthode consiste à préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 %, à partir d'une culture de 24 heures sur gélose non sélective. La densité de cette suspension est ajustée entre 0,08 et 0,10 à 625 nm, ce qui correspond à 0.5McFarland ensemencée par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur. Les disques d'antibiotiques de 60mm sont ensuite déposés sur la gélose ensemencée, en les séparant d'un espace de 30 mm les uns des autres. Les antibiotiques utilisés sont résumés dans le tableau de l'**annexe 4**.

Après prédiffusion pendant 15 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

La lecture est réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont interprétés selon les recommandations de la standardisation de l'antibiogramme. Trois catégories de souches sont définies en fonction du diamètre des zones d'inhibition : Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistant (R).

Les résultats de l'antibiogramme sont validés en utilisant une souche de référence sensible (*E. coli* K12 BM21) aux antibiotiques.

Pour certaines souches bactériennes, le E-test, déterminant la CMI a été réalisé. Le protocole détaillé est en annexe 4.

II. 6. 2. Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* :

La détection des BLSE a été effectuée par la méthode DDS « double disk synergy » (Jarlier et al., 1988; Vedel et al., 1994). Le principe de cette méthode consiste à déposer des disques d'antibiotiques marqueurs de l'activité BLSE sur une gélose MH ensemencée par écouvillonnage d'une suspension bactérienne de 0.5 McFarland.

Dans ce test, l'acide clavulanique est utilisé comme inhibiteur des BLSE, son disque (utilisé sous forme d'association avec l'amoxicilline : AMC) est placé à 30 mm de distance

centre à centre des disques contenant les antibiotiques indicateurs de l'activité BLSE: céfotaxime, céftazidime, ceftriaxone, céfépime, céfpirome et aztréonam. Après prédiffusion des antibiotiques pendant 15 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

La présence des BLSE est détectée par l'augmentation de la zone d'inhibition autour d'au moins un disque indicateur de l'activité BLSE en direction du disque d'AMC contenant l'inhibiteur des BLSE. L'augmentation de la zone d'inhibition est due à une synergie entre l'acide clavulanique et les antibiotiques indicateurs, cette synergie se traduit par des images caractéristiques en forme de bouchon de champagne, de bâtonnets, d'entonnoir,...etc.

Un test de confirmation de double disque est réalisé devant tout diamètre de C3G < 27mm, afin de confirmer la synthèse d'une BLSE par la souche étudiée. Le protocole est résumé en **annexe 4**.

Les protocoles liés à la recherche des métallo-carabapénèmases et des SARM sont résumés dans l'**annexe 5**.

II. 7. Recherche des facteurs de virulence des entérobactéries :

Afin de déterminer le profil de virulence des entérobactéries, nous avons recherché plusieurs facteurs de virulence liés à leur pathogénicité et donc à leur pouvoir infectieux. Nous avons recherché sur le plan phénotypique : la capsule, le phénotype d'hypermucoviscosité, la production de prodigiosine et d'hémolysine, la formation de biofilm ainsi que l'effet bactéricide du sérum humain. Par ailleurs, nous avons réalisé des tests de pathogénicité en déterminant la dose létale dans un modèle murin.

II. 7. 1. Recherche de la capsule polysaccharidique, le phénotype d'hypermucoviscosité et la prodigiosine :

La présence de la capsule a été recherchée par coloration à l'encre de Chine. Sur une lame, une goutte de suspension bactérienne est mélangée à une goutte d'encre de Chine. Le résultat est obtenu après une observation au microscope photonique. Si la bactérie est encapsulée, l'encre de Chine diffuse à travers la paroi et colore le cytoplasme en noir : la capsule apparaît alors comme un halo lumineux autour de la bactérie. Si la bactérie est non encapsulée, elle apparaîtra en noir dans sa totalité (**Wiskur et al., 2008**).

Le phénotype d'hypermucoviscosité (HMV) a été recherché par le « String test » (**Wiskur et al., 2008**). L'étendue en verticale d'une seule colonie obtenue après une culture de 24

heures sur gélose BHIA est évaluée approximativement à l'aide d'une anse de platine. Une hauteur supérieure à 5 mm est indicatrice du phénotype d'hypermucoviscosité (HMV+). Une hauteur inférieure à 1 mm indique l'absence du phénotype d'hypermucoviscosité (HMV-).

La prodigiosine est un pigment rouge issu du métabolisme de *Serratia marsecens*. Les souches productrices de ce pigment apparaissent sous forme de colonies rouges, après ensemencement dans la gélose Luria Bertani à 30°C pendant 24h (**Hardjito et al., 2002**).

II. 7. 2. Recherche du pouvoir hémolytique :

Le pouvoir hémolytique des entérobactéries a été recherché en utilisant du sang humain selon le protocole, modifié, de **Srinivasan et al. (2017)**.

Le sang frais est collecté dans un tube contenant du citrate comme anticoagulant. Les érythrocytes sont séparés du plasma riche en plaquettes par centrifugation à 3500 rpm pendant 15 min à 4°C puis lavés 3 fois avec du tampon PBS, pH 7.2. Les érythrocytes lavés sont alors resuspendus dans du tampon PBS à une concentration finale de 2% et conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Les souches sont cultivées dans du milieu LB puis incubées une nuit à 30°C. 500µl d'érythrocytes à 2% sont ajoutés au même volume des cultures bactériennes, puis incubés à 37 ° C pendant 2 h. Après centrifugation, l'activité hémolytique est mesurée dans le surnageant par spectrophotométrie à 405 nm (La densité optique est proportionnelle à l'hémoglobine libérée).

Le contrôle positif consiste à incuber les érythrocytes avec de l'eau distillée, alors que le contrôle négatif consiste à incuber les érythrocytes avec du PBS. Le pourcentage de lyse a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{A_{405}(\text{échantillon}) - A_{405}(\text{Ctr négatif}) \times 100}{A_{405}(\text{Ctr positif}) - A_{405}(\text{Ctr négatif})}$$

A₄₀₅ : Absorbance à 405nm ; Ctr : control Ctr+ : eau distillée

II. 7. 3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain :

L'effet bactéricide du sérum humain par activation du complément a été étudié par une méthode décrite par **Fierer et al. (1972)** ; il s'agit de la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide.

Une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle diluée à 1/500 est ensemencée par étalement sur gélose MH. Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, 50 µl de sérum sont déposés au centre de la boîte de culture. La présence ou l'absence de croissance bactérienne, observée à l'endroit du dépôt du sérum après incubation toute la nuit à 37°C, témoigne de la résistance ou de la sensibilité de la souche testée. La souche *E. coli* K12-BM21 sensible au sérum est utilisée comme témoin de l'activité du sérum.

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain d'individus sains. Le sang est prélevé dans des tubes secs, puis incubés à température ambiante pendant 2 à 4 heures pour permettre la coagulation. Le caillot formé est enlevé avant de centrifuger le contenu des tubes à 120 000 rpm pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45µm, aliquoté puis conservé à -20°C.

II. 7. 4. Recherche de la formation de Biofilm

Les biofilm sont recherchés à partir d'une culture d'une nuit à 30 ° C dans du LB. Une dilution au 1 :100 est réalisée (dans 200µl de LB), puis déposée dans une microplaque de 96 puits et incubée une nuit à 30 ° C. Les biofilms sont colorés au cristal violet (0,1%) ; Le colorant est solubilisé avec de l'acide acétique glacial (33%) et mesuré par spectrophotométrie à 570-590nm (**Lin et al., 2010 ; Maldonado et al., 2006 ; Shanks et al., 2013**). L'intensité du biofilm formé est lue comme suit : selon (**Maldonado et al., 2006**)

- DO > 0.5 : Biofilm de forte intensité.
- 0.1 < DO < 0.5: Biofilm de moyenne intensité
- DO < 0.1 : Biofilm de faible intensité.

II. 7. 5. Test de pathogénicité

La virulence des souches de *S. marsecens* a été évaluée *in vivo* sur des souris infectées par voie intra-péritonéale. Les souris utilisées ont été des mâles de type BALB/c et C57BL/6, de 20 ± 2 g provenant de la FSB/USTHB (Alger, Algérie).

La culture de la souche bactérienne a été faite sur milieu LB à 30°C. Les souris ont reçu une injection de doses croissantes de bactéries en phase de croissance logarithmique, allant de 10⁶ à 10⁸ CFU dans 0.1 ml d'eau physiologique stérile. Un lot de 6 souris a été utilisé pour chaque concentration bactérienne et un lot témoin n'a reçu aucune injection. L'observation du nombre de morts s'est faite sur 7 jours et la DL50 a été calculée selon la méthode de **Reed et Muench, (1938)**.

I. Epidémiologie :

I. 1. Répartition des prélèvements selon la positivité de la culture :

Après analyse macroscopique, microscopique et mise en culture, nous avons constaté que 81 (39.9%) des prélèvements reçus au laboratoire étaient positifs, comme nous pouvons le voir dans la **figure 6**.

Dans notre étude nous avons constaté que les prélèvements qui incriminaient des agents pathogènes étaient faibles comparés aux prélèvements négatifs. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de la maladie ; prélèvement pratiqué sous antibiothérapie, quantité insuffisanteensemencée ou enfin une origine non bactérienne (Denis et al., 2011).

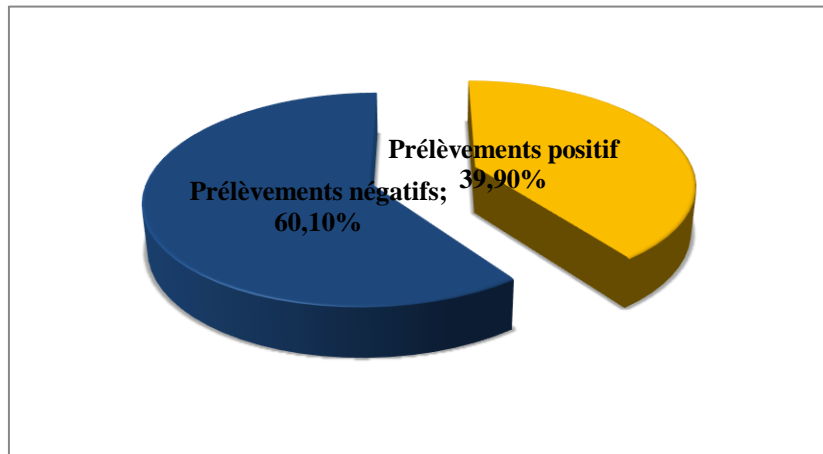


Figure 6 : Répartition des prélèvements biologiques selon la positivité de la culture.

I. 2. Répartition des prélèvements positifs selon le sexe :

Les résultats montrent que les prélèvements positifs étaient prévalents chez les hommes comparés aux femmes ; ils représentaient un taux de 58% (**Figure 7**).

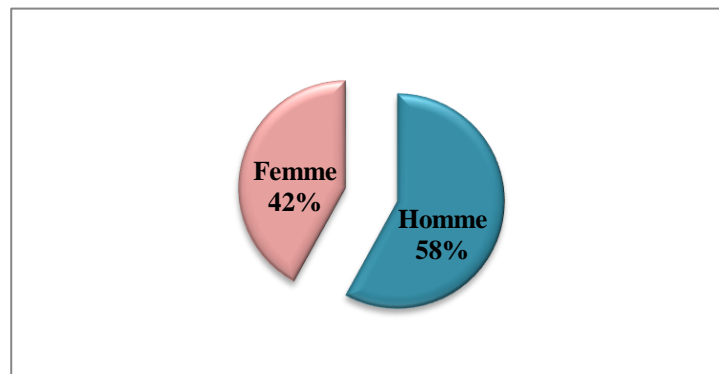


Figure 7 : Répartition des prélèvements biologiques positifs selon le sexe des patients cancéreux.

Ces résultats peuvent être justifiés par une incidence élevée de la survenue de cancer chez les hommes comparé aux femmes comme le rapporte la littérature. Les hommes sont au plus haut risque de la plupart des cancers non liés au sexe, avec les rares exceptions des cancers de la thyroïde et de la vésicule biliaire. L'exposition aux facteurs de risque (Tabac, Alcool, produits chimiques...) et une protection hypothétique par les hormones sexuelles féminines sont souvent rapportés comme étant à l'origine de cette différence d'incidence du cancer entre l'homme et la femme (Edgren et al., 2012).

I. 3. Répartition des prélèvements positifs selon l'âge :

La moyenne d'âge retrouvée chez les patients avec culture positive était de 49 ans. La tranche d'âge où l'on trouve une prédominance des prélèvements positifs est celle de 35 à 50ans et 50 à 65ans avec un pourcentage de 23.46% (Figure 8). Le groupe X correspond au groupe de patients dont on ne connaît pas l'âge.

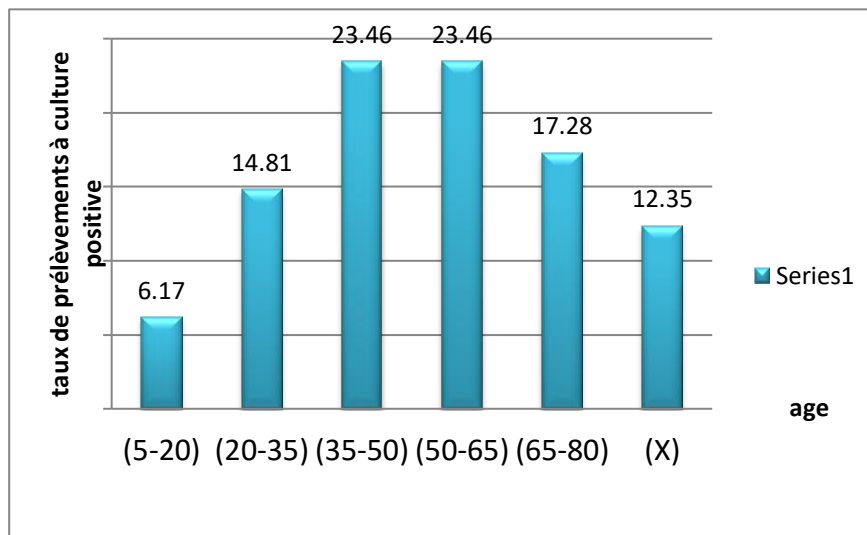


Figure 8: Répartition des prélèvements biologiques selon les tranches d'âge des patients cancéreux.

Le cancer est un phénomène directement lié à l'apparition et l'accumulation de mutations au cours de la vie, ainsi que la diminution de l'immunité et mécanismes de défenses de l'organisme. En général, l'incidence du cancer augmente avec l'âge, jusqu'à l'âge de 75 ans, avec un risque de diagnostic de cancer de 39% sur toute la vie. L'âge médian de tout diagnostic de cancer est de 66 ans. Cependant, la moyenne d'âge de notre population était de 49ans, ce qui correspond à une population cancéreuse relativement jeune contrairement à la population occidentale. Cette différence serait dûe au mode de vie et aux conditions socio-économiques et culturelles liés au pays d'origine (Bounedjar, 2016. Howlader et al., 2017).

Le processus de vieillissement, en *soi* (vieillesse physiologique), ou en raison des comorbidités associées, telles que le diabète, les maladies rénales et l'hypertension, peut avoir un effet négatif sur la dynamique des neutrophiles. Une altération des fonctions immunitaires est observée avec l'augmentation de l'incidence des infections du patient cancéreux (Aslani et al., 2000).

I. 4. Répartition des prélèvements positifs selon le type de cancer :

Nous avons recensé 14 types de cancer chez les patients dont le prélèvement était positif. Nous remarquons que la moitié des patients (50.62%) étaient traités pour une leucémie. Il est important de signaler que pour 9 patients, nous n'avons pas pu avoir l'information concernant le type de cancer (Figure 9). Les résultats que nous avons obtenus sont similaires à ceux de Lang et al. (2001) qui a signalé une plus grande proportion d'isolats, résistants qui plus est, en oncohématologie comparés aux unités de soins intensifs. Ils attribuent cette forte densité à l'état d'immunodépression et à l'utilisation accrue des antibiotiques (particulièrement les fluoroquinolones) chez les patients hématologiques.

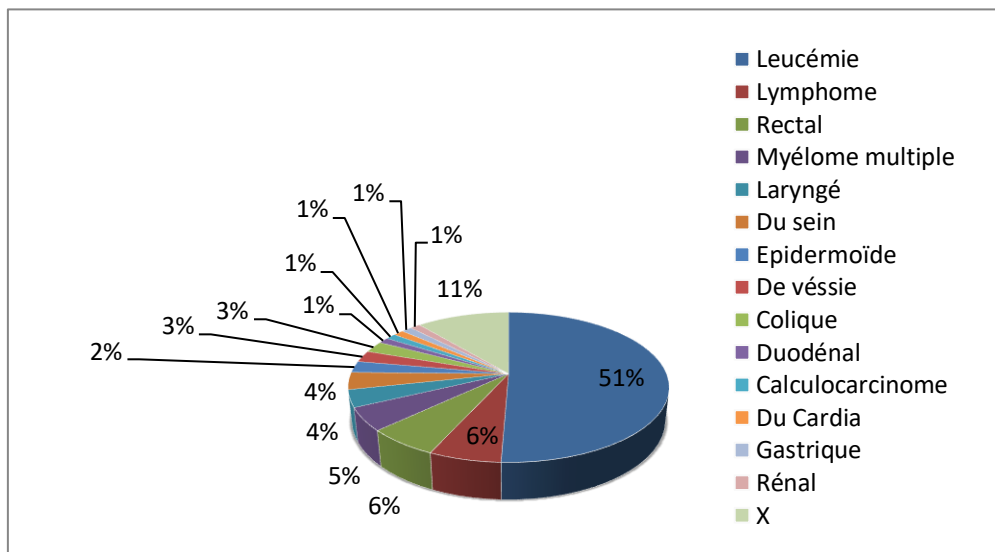


Figure 9 : Répartition des prélèvements biologiques positifs selon le type de cancer.

Les infections sont un des problèmes majeurs en oncohématologie. En effet, une infection sévère est diagnostiquée chez près de 80% des malades ayant une leucémie aiguë, 75% des malades ayant un lymphome et 50% des malades ayant un myélome. La fréquence des infections chez les patients ayant une tumeur solide est moindre, sauf lorsque les traitements deviennent intensifs ou en phase palliative pré-terminale (Girmenia et Menichetti, 2011).

De nombreux facteurs vont être à l'origine de l'augmentation du risque infectieux qu'ils soient liés à la chimiothérapie anti-cancéreuse (neutropénie, trouble de l'immunité cellulaire et humorale), à la tumeur ou aux dispositifs intra-corporels. Les facteurs mécaniques locaux provoqués par les tumeurs sont responsables :

- ✓ des atteintes des barrières anatomiques habituelles aux infections (invasion cutanée, invasion des voies digestives et respiratoires).
- ✓ de l'obstruction des voies respiratoires ou digestives entraînant un ralentissement du flux normal des excréta (rétention bronchique, occlusion intestinale) et une surinfection locale.

La présence de cathéters intra-veineux, de sondes urinaires, de stomies (trachéostomie, urétérostomie) sont autant de portes d'entrée importantes pour les germes, pouvant entraîner l'augmentation du risque infectieux chez le cancéreux. Ce risque est d'autant plus important pendant et après une chirurgie anti-cancéreuse où la pose de dispositifs médicale est inévitable (Girmenia et Menichetti, 2011 ; Gafter-Gvili et al., 2012).

I. 5. Répartition des prélèvements positifs selon sa nature :

Au cours de notre travail de recherche, nous avons reçu au laboratoire différents types de prélèvements biologiques de patients atteints de cancer et suivis au centre anti-cancer (CAC) de l'hôpital Frantz Fanon de Blida. Nous avons constaté que la majorité des prélèvements positifs étaient ceux du pus (41,97%), suivi par le sang (19,75%) comme nous pouvons le voir dans la **figure 10**.

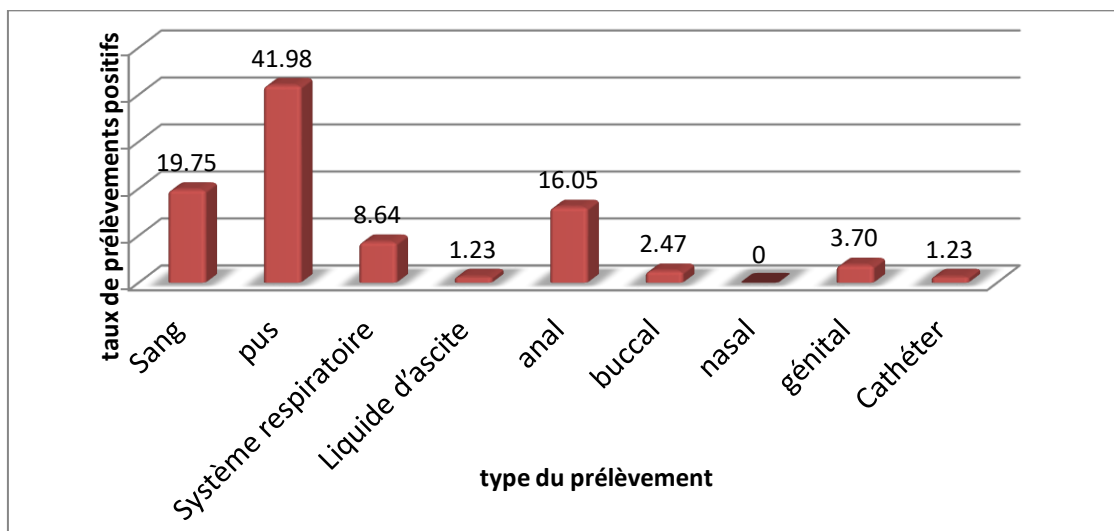


Figure 10 : Répartition des prélèvements biologiques positifs selon leur nature.

Cela est dû à la surinfection des plaies post opératoires par des germes qui proviennent de la peau ou des muqueuses non stériles touchées durant l'intervention chirurgicale. Les sources exogènes peuvent être : le personnel chirurgical, l'environnement de la salle opératoire et tous les instruments qui entrent en contact avec le site opératoire. (Mangram et al., 1999)

I. 6. Répartition des prélèvements positifs selon le traitement anti-cancéreux :

Les patients adressés au CAC sont, pour la majorité d'entre eux, soumis à des cycles de chimiothérapie (54.32%). Un faible pourcentage de patients étaient traités par Chimiothérapie/radiothérapie (2.47%), Chimiothérapie/autogreffe (2.47%) et radiothérapie (1.23%). 13.58% des patients admis au CAC ne subissaient aucun traitement anticancéreux (Figure 11). Le groupe X correspond aux patients dont nous n'avons aucune information concernant la thérapie anticancéreuse qu'ils suivent.

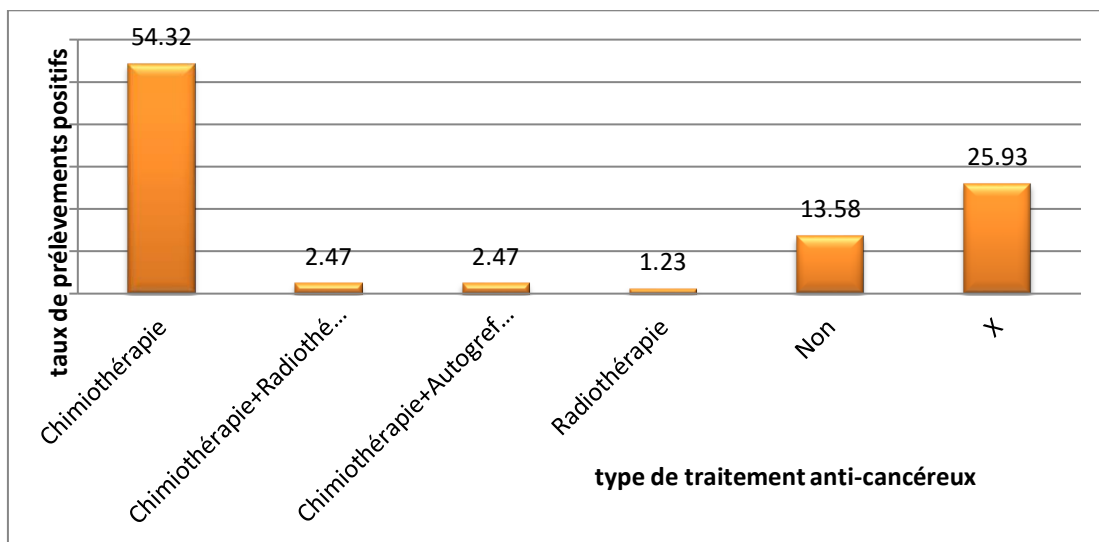


Figure 11 : Répartition des prélèvements biologiques positifs selon la thérapie anti-cancéreuse.

La survenue d'infection chez le patient cancéreux est souvent imputable aux effets secondaires de la thérapie anticancéreuse, particulièrement la chimiothérapie. Les effecteurs cellulaires et solubles du système immunitaire en font généralement les frais. En effet, une neutropénie, une altération des barrières cutanéomuqueuses et des troubles de l'immunité cellulaire et humorales sont souvent observées chez les cancéreux (Sylvester et Pharm, 2003 ; Stelle, 2012).

La neutropénie est la diminution du taux des neutrophiles à 1700 éléments/mm³. Dans notre étude, nous avons observé 62,8% épisodes neutropéniques. Il est admis que 10 à 20% des malades feront, au cours de l'une des cures de chimiothérapie, un problème fébrile et éventuellement infectieux grave. Le risque infectieux est directement lié à l'étendue de la neutropénie. En effet, ce risque ne survient pas avant que la neutropénie ne soit au-dessous de 1000 polynucléaires par mm³, mais devient important au-dessous de 500 polynucléaires par mm³, et majeur ou quasi constant au-dessous de 100 polynucléaires par mm³. Le risque infectieux devient quasi constant et nécessite des mesures d'isolement préventif systématiques, au-delà de quelques jours avec une neutropénie majeure. On observe parfois une altération des fonctions phagocytaires des polynucléaires en général, sans pour autant qu'il y ait une neutropénie, en rapport aussi avec la chimiothérapie et aboutissant aux mêmes effets (Sylvester et Pharm, 2003, Stelle, 2012).

I. 7. Espèces identifiées :

Les cultures positives que nous avons obtenu ont été soumises à des tests d'orientation ainsi qu'à une identification biochimique par les galeries miniaturisées API. Nous avons réussi à isoler 111 souches bactériennes, dont 71.17% (n=79) de bacilles à Gram négatif et 28.82% (n=32) de cocci à Gram positif (**Tableau III**).

La prévalence des infections à Gram négatif et positif chez le cancéreux a toujours été en constante évolution. Alors qu'au cours des années 1960 et 1970, c'est les Gram négatif qui prédominaient, la tendance s'est inversée durant les années 1980 et 1990, où l'on notait une émergence inquiétantes des infections à Gram positifs dans les centres anti-cancer. Ceci est, probablement, dû à l'utilisation des cathéters veineux et l'administration systémique des fluoroquinolones en prophylaxie, des facteurs qui favorisent la pénétration et la colonisation des organes par des bactéries à Gram positifs issues du microbiote cutané et intestinal (**Girmenia et Menichetti, 2011**).

Nous remarquons d'après l'analyse du **tableau IV** que 79.74% des bacilles à Gram négatif identifiés étaient des bacilles fermentaires de la famille des *Enterobacteriaceae*. Concernant les cocci à Gram positif, c'est l'espèce *Staphylococcus aureus* qui était prédominante avec un taux de 46.87%.

Les espèces identifiées ont été réparties selon le type de prélèvement. Les résultats de cette répartition montrent que, la majorité des souches ont été isolées à partir du pus (47.74%) ce taux est suivi par celui sang (17.11%) (**Tableau IV**).

Contrairement aux résultats que nous avons obtenus dans cette étude, de nombreux rapports épidémiologiques rapportent la prédominance des staphylocoques parmi les isolats du sang chez le patient cancéreux (Cattaneo et al., 2008 ; Morris et al., 2008). La réémergence des infections à Gram négatif fermentaires (Entérobactéries) et non fermentaires (*Pseudomonas*) ont été observés dans plusieurs centres anti-cancer (Girmenia et Menichetti, 2011 ; Gudiol et al., 2011).

Dans notre étude, les entérobactéries étaient nombreuses (79.74% %). La source de ces bactéries peut être endogène ou exogène. En effet, les traitements anti-cancéreux provoquent l'inflammation de l'ensemble des muqueuses, favorisant l'entrée dans la circulation de bactéries et de levures présentes dans le tube digestif. À la phase initiale d'une neutropénie, la plupart des infections ont une source « endogène » à partir des entérobactéries commensales. Plus tard, elles peuvent être d'origine exogène, en particulier nosocomiale (personnel hospitalier, nourriture, cathéters centraux) (Chandesris et al., 2007 ; Goyette, 2012).

II. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques :

Dans ce volet, nous avons évalué et caractérisé la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques principalement les β -lactamines, les aminosides, les macrolides et apparentés, les quinolones, les tétracyclines, les sulfamides et association, les glycopeptides.

II. 1. Résultats de l'antibiogramme :

Toutes les souches isolées et identifiées ont subi un antibiogramme afin de déterminer leur profil de résistance aux antibiotiques. Dans ce qui suit, nous allons interpréter puis discuter les résultats de l'antibiogramme pour les principales familles d'antibiotiques.

II. 1. 1. β lactamines :

Nous avons remarqué que les taux de résistance les plus élevés, dans la famille des β -lactamines, étaient vis-à-vis de l'ampicilline (56,19%), suivis par l'ampicilline + acide clavulanique (47.57%). La résistance au céfazoline, une C1G, était de 40.77%. Une résistance aux C3G a aussi été observée chez 34.95% des souches concernant le céfotaxime, la ceftriaxone et la ceftazidime. Un pourcentage non négligeable de souches était résistant à

L'imipénème (8.73%) (**Figure 12**). Des résultats similaires ont été rapportés par une étude italienne menée par **Trecarichi et al. (2009) (2011)** dans différents centres anticancéreux.

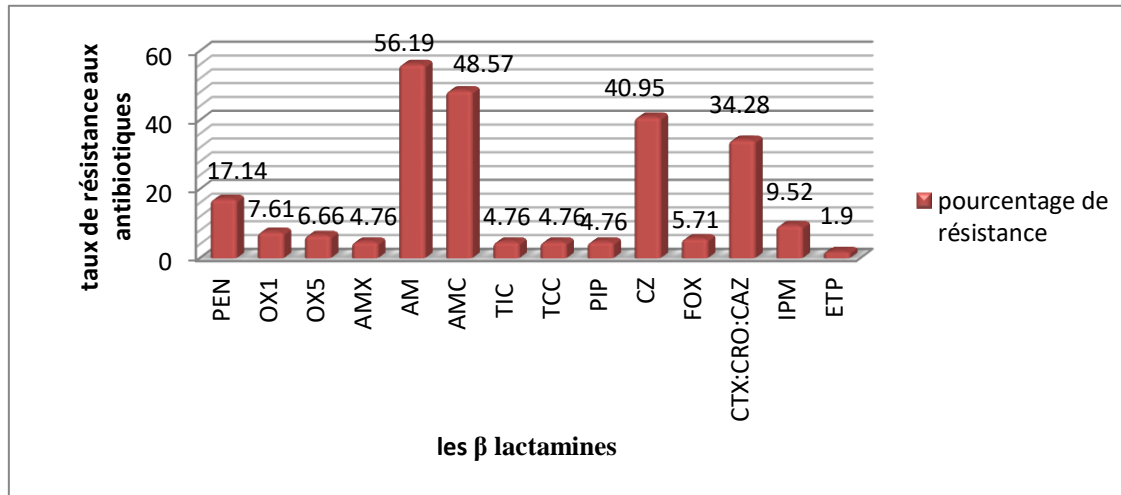


Figure 12 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des β -lactamines.

Comme attendu, les souches isolées faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* étaient dans la majorité (90.47%) résistantes à au moins un membre des β lactamines. Ce constat, rapporté également par différentes études, est la conséquence d'une part de la production de β -lactamases chromosomiques responsables de la résistance intrinsèque par la majorité des entérobactéries, d'autre part de la pression de sélection due à la prescription massive et l'usage souvent abusif des antibiotiques de type β -lactame, aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Ceci conduit à la transmission croisée des résistances acquises à déterminisme plasmidique (**Peleg et al., 2010 ; Iredell et al., 2015**).

Par ailleurs, nous avons révélé la présence de souches productrices de β -lactamases à spectre élargi. En effet, 30 souches d'entérobactéries, soit 29.12%, présentaient un phénotype BLSE, qui s'est traduit par une image de synergie entre le disque d'AMC et de CTX ou CRO (**Figure 13**).

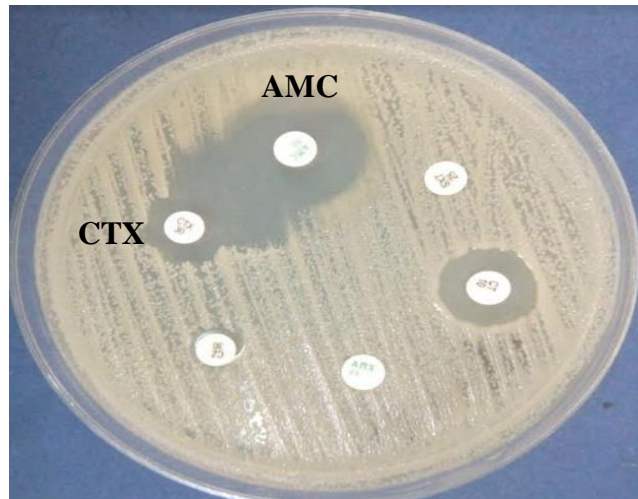


Figure 13 : Détection du phénotype BLSE par le test DDS.

La fréquence d'isolement des entérobactéries productrices de BLSE a atteint un niveau alarmant dans notre étude. En effet, les fréquences que nous avons rapportées sont nettement supérieures à celles rapportées **Oliveira et al. (2007)** et **Collin et al. (2001)**. Toutefois, ces fréquences sont plus faibles que celles mentionnées dans l'étude de **Gudiol et al. (2011)**.

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de (C1G, C2G, C3G et C4G) et l'aztréonam. Les gènes de structure sont portés par des éléments génétiques mobiles tels que de grands plasmides, intégrons ou transposons. Ces éléments sont transférables entre souches de la même espèce ou entre espèces (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

Les bactéries à Gram négatif résistantes aux antibiotiques causent, de nos jours, un nombre important d'infections chez les patients cancéreux neutropéniques et fébriles. Les espèces les plus concernées sont *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* productrice de BLSEs. Ces dernières sont souvent sensibles aux carbapénèmes, antibiotiques à très large spectre d'activité mais dont l'utilisation augmente le risque d'infections causées par les souches productrices de carbapénémase telles que les Klebsielles (**Girmania et Menichetti, 2011**).

Parmi les souches du genre *Pseudomonas* que nous avons identifiées, 2 étaient résistantes aux β lactamines (Profil : TICC, TCC, PIP, CAZ, IMP), une prévalence beaucoup plus faible que celle rapportée par **Aubron et al. (2005)**. Cette résistance pourrait être liée à l'expression de mécanismes de résistance naturels aux β lactamines. En effet, presque toutes les souches de *Pseudomonas* produisent une β -lactamase à large spectre, AmpC, dont l'expression est induite

par certaines β -lactamines. Elle hydrolyse rapidement les aminopénicillines (amoxicilline et ampicilline), les céphalosporines C1G et C2G, mais affecte peu, la ticarcilline, la pipéracilline, les C3G ou les carbapénèmes. En revanche, par un mécanisme encore mal compris, l'enzyme AmpC est capable de « neutraliser » le céfotaxime et la ceftriaxone, conférant ainsi au bacille pyocyanique une résistance naturelle de bas niveau à ces antibiotiques largement utilisés en milieu hospitalier (Mérens et al., 2011).

Par ailleurs, nos résultats montrent aussi que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la pénicilline (n=14), probablement, par un mécanisme enzymatique mettant en jeu une penicillinase qui hydrolyse le noyau β lactame de l'ampicilline (Pantosti et al., 2007).

Nous avons aussi mis en évidence des souches de *Staphylococcus aureus* de phénotype SARM ; ils représentaient 4.85% de l'ensemble des souches identifiées. Le phénotype SARM est largement décrit dans les pathologies infectieuses du cancéreux et tout comme les souches BLSE, il pose de sérieux soucis aux cliniciens qui se voient limiter dans leurs options thérapeutiques. En effet, contrairement aux souches sensibles (MSSA), les SARMs sont le plus souvent multirésistantes vis-à-vis de nombreuses classes d'antibiotiques (macrolides, aminosides et fluoroquinolones) (Jones et al., 2003).

II. 1. 2. Aminosides :

La résistance à la gentamicine a concerné 24.27% des souches identifiées, elle représente le taux le plus élevé dans la famille des Aminosides. Cette résistance est suivie par celle à l'amikacine (6.79%) et la kanamycine (5.82%). Les taux les plus faibles ont été enregistrés pour la streptomycine (2.91%), la nétilmicine (1.94%) et la tobramycine (0.97%) (Figure 14).

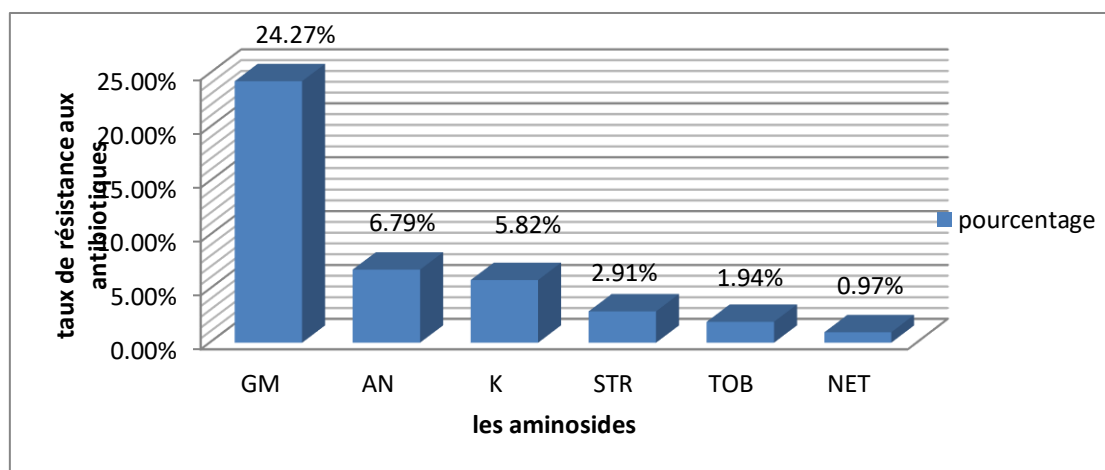


Figure 14 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des aminosides.

Malgré leur toxicité (rénale et cochléovestibulaire) bien connue, les aminosides gardent une place importante dans le traitement des infections nosocomiales en raison de la possibilité d'une association avec une β -lactamine (ou parfois une fluoroquinolone). Cependant, l'augmentation de la résistance des bactéries hospitalières à ces molécules a réduit fortement leur efficacité (Garneau-Tsodikova et Labby, 2016 ; Krause et al., 2016).

La résistance aux aminosides a été observée aussi bien chez les Gram négatif fermentaires que non fermentaires. En effet, 3 souches de *P. aeruginosa* parmi celles que nous avons identifiées étaient résistantes à la gentamycine. Le mécanisme de résistance le plus fréquent, parmi les isolats cliniques de *P. aeruginosa*, est dû à la production d'enzymes modifiant les aminosides les empêchant de se fixer sur le ribosome (Poole, 2005 ; Mérens et al., 2011).

II. 1. 3. Quinolones/Fluoroquinolones :

Concernant cette famille d'antibiotiques, nous avons observé le taux de résistance le plus élevé pour la ciprofloxacine (38.83%). Les taux de résistance au levofloxacine (11.65%) et à l'acide nalidixique (10.67%) étaient proches (Figure 15).

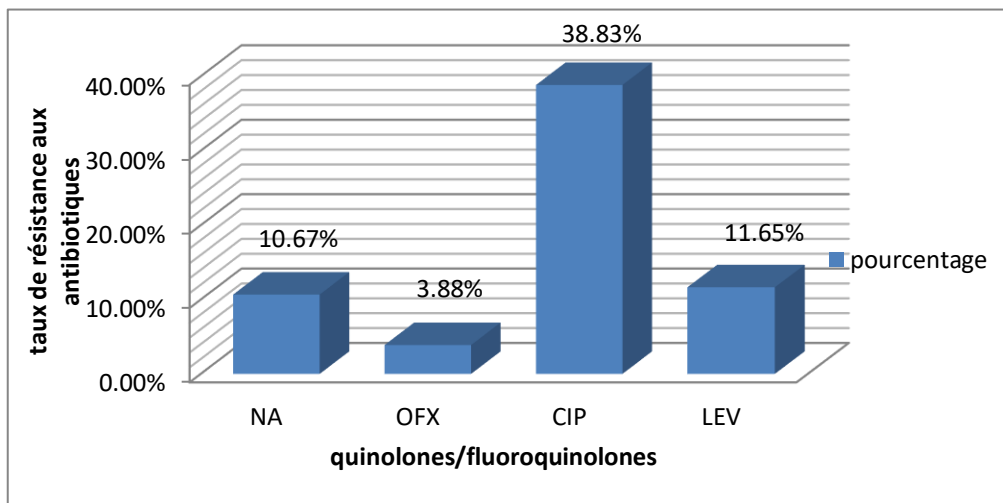


Figure 15 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des quinolones/fluoroquinolones.

Cette résistance pourrait être liée, chez les entérobactéries, à la présence de mutations dans les régions *QRDR* (Quinolone Resistance Determining Region) des topoisomérases II. Ces mutations ont pour effet de diminuer l'affinité des quinolones pour leurs cibles (Cambau et Guillard, 2012 ; Cattoir, 2012).

Nous avons aussi remarqué, dans notre étude, une résistance à la ciprofloxacine et à levofloxacine de la part de certaines souches de *P. aeruginosa*. Ces antibiotiques possèdent une bonne activité intrinsèque sur *P. aeruginosa*. Cependant, ils ne doivent pas être utilisés en monothérapie dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* en raison de l'émergence fréquente des mutants des cibles GyrA et ParC (Mérens et al., 2011).

II. 1. 4. Tétracyclines, sulfamides et association

Nos résultats montrent que la résistance à la tétracycline est nettement plus élevée (12.62%) que celle vis-à-vis de la tigécycline (0.97%). Nous avons aussi noté que 35.92% de souches étaient résistantes au cotrimoxazole (SXT) (Figure 16). Ceci veut, probablement dire, que plus de la moitié de nos souches utilisent un mécanisme enzymatique de résistance au SXT par l'expression des enzymes DHPS (Dihydropteroate synthétase) et DHFR (Dihydrofolate réductase) codées respectivement par les gènes plasmidiques *sul* et *dfr* (Alekhshun et Levy, 2007).

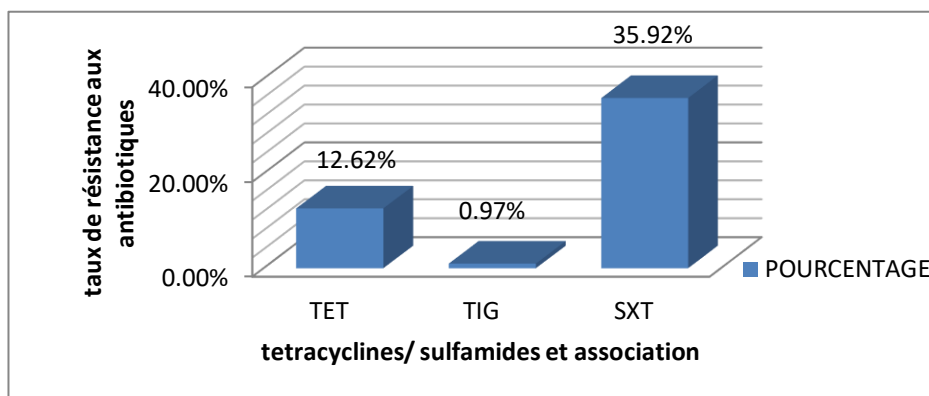


Figure 16 : Résultats de l'étude de l'antibiorésistance vis-à-vis des tétracyclines, sulfamides et association.

II. 2. Profils de résistance aux antibiotiques des souches isolées :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de déterminer les profils de résistance des souches objets de notre étude (Tableau V en annexe 6). Il ressort de l'analyse de ces profils que :

- 75 profils de résistance différents et de diverses origines ont été obtenus.
- 47.74% des souches étaient de phénotype MDR « Multi Drug Resistant » résistantes à au moins 3 familles d'antibiotiques. Elles sont réparties dans 32 profils différents (**Tableau V**).
- La multirésistance a été observée dans la majorité des cas chez les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae*.
- La majorité des souches MDR ont été identifiées à partir du pus (18.01%) et du sang (11.71%) (**Tableau VII**).

Tableau VII : Répartition des souches selon la multirésistance.

Espèces	MDR	Non MDR
<i>Staphylococcus aureus</i>	(n=5)	(n=10)
<i>Staphylococcus à coagulase négative</i>	(n=1)	/
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(n=1)	/
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	(n=2)	/
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(n=2)	/
<i>Escherichia coli</i>	(n=10)	(n=12)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(n=3)	(n=4)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	/	(n=1)
<i>Aerococcus urinae</i>	(n=1)	/
<i>Neisseria spp</i>	(n=1)	/
<i>Serratia marcescens</i>	(n=1)	(n=1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(n=11)	(n=7)
<i>Citrobacter freundii</i>	(n=1)	/
<i>Citrobacter koseri</i>	/	(n=2)
<i>Morganella morganii</i>	(n=1)	(n=1)
<i>Providencia stuartii</i>	(n=1)	/
<i>Proteus mirabilis</i>	(n=1)	(n=3)
<i>Proteus vulgaris</i>	(n=1)	/
<i>Haemophilus spp</i>	/	(n=1)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	(n=2)	(n=2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(n=)	(n=8)
<i>Pseudomonas spp</i>	(n=1)	(n=1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(n=4)	(n=1)
<i>Enterococcus faecium</i>	(n=2)	/
<i>Enterococcus spp</i>	(n=1)	(n=1)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	/	(n=1)
<i>Streptococcus mitis</i>	/	(n=1)
<i>Streptococcus groupe D</i>	/	(n=1)

Tableau VIII: Répartition des souches MDR/non MDR selon le type de prélèvement

Origine	MDR	Non MDR
Sang	(n=13)	(n=6)
cathéter	(n=1)	/
Pus	(n=20)	(n=33)
p. du système respiratoire	(n=1)	(n=8)
Liquide d'ascite	(n=1)	(n=1)
p. nasal	/	/
p.buccal	(n=1)	(n=1)
p.anal	(n=13)	(n=3)
p.génital	(n=1)	(n=4)
Urines	(n=2)	(n=2)

L'évolution épidémiologique des complications infectieuses chez les patients cancéreux se caractérise, non seulement, par l'incidence croissante de certaines infections opportunistes, mais aussi par l'émergence d'une résistance antimicrobienne multiple chez plusieurs bactéries (**Girmania et Menichetti, 2011**).

Le taux des souches MDR retrouvé dans notre étude est nettement plus élevé que ceux rapportés par **Oliveira et al. (2007)** et **Gudiol et al. (2011)**. Il est le reflet d'une importante hétérogénéité génétique des mécanismes de résistance aux antibiotiques, chez ces souches et est la conséquence directe de l'utilisation abusive des céphalosporines de 3^{ème} génération en association avec d'autres antibiotiques, particulièrement, les fluoroquinolones, chez les patients cancéreux. L'environnement hospitalier et la durée d'hospitalisation contribuent aussi à l'émergence des souches MDR.

De plus, dans notre étude, nous avons mis en évidence une association des deux phénotypes MDR et BLSE dans la même souche 17.11% Cette association pourrait s'expliquer par la co-localisation des gènes de BLSE et d'autres gènes de résistances sur le même support génétique (**Hawekey et Jones, 2009 ; Ramirez et al., 2014**). Cette situation est très alarmante et conduit à une impasse thérapeutique. Les alternatives étant limitées, les praticiens sont obligés d'avoir recours aux molécules « de réserve » tels que les carbapénèmes.

III. Caractérisation phénotypique de la virulence potentielle des entérobactéries :

L'étude de la virulence n'a concerné que les souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ; elles étaient au nombre de 40. Nous avons recherché deux types de facteurs de virulence parmi les entérobactéries :

- Les facteurs de virulence communs et qui comprenaient la résistance au système du complément (sérum humain), le pouvoir hémolytique et la formation de biofilm.
- Les facteurs de virulence spécifiques et qui comprenaient la capsule, le phénotype d'hypermucoviscosité et la production de prodigiosine.

III. 1. Recherche des facteurs de virulence communs

L'étude de l'effet bactéricide du sérum humain par la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide a permis de classer les souches dans deux phénotypes : sensible (S) et résistant (**Figure 17**), sur la base de la présence ou non d'une zone d'inhibition à l'endroit du spot. Les résultats montrent que la quasi-totalité des souches étaient résistantes au sérum humain (92.5%). Seules 3 souches d'*E. coli* en étaient sensibles.



Figure 17 : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain sur nos souches.

A : phénotype sensible au sérum (S) ; **B** : phénotype résistant au sérum (R).

Le système du complément est l'un de ces mécanismes de défense dit « non spécifique », dont l'activation aboutit à l'élimination du germe infectieux. En effet, l'activation de ce système permet la génération d'opsonines (C3b, C4b) et d'anaphylatoxines (C5a, C3a, C4a),

facilitant la phagocytose des bactéries et la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) aboutissant à la lyse de la cellule bactérienne. La résistance au système du complément est l'apanage des bactéries pathogènes invasives qui causent des infections profondes. Cette résistance pourrait s'expliquer par la présence de structures bactériennes telles que la capsule, le LPS et les protéines de la membrane externe (Doorduyn *et al.*, 2016). La mise en évidence de ces souches dans notre étude est inquiétante, car elle prédispose les patients cancéreux à des infections systémiques dont l'issue pourrait être fatale.

Toutes les entérobactéries de notre étude pouvaient former un biofilm dont l'intensité fut mesurée par la méthode d'absorption du cristal violet. Le biofilm pouvait être de forte, moyenne ou de faible intensité, comme illustré dans le **tableau VIII** et la **figure 18**. Il ressort de l'analyse de ce tableau que la majorité des biofilms formés étaient de forte intensité.

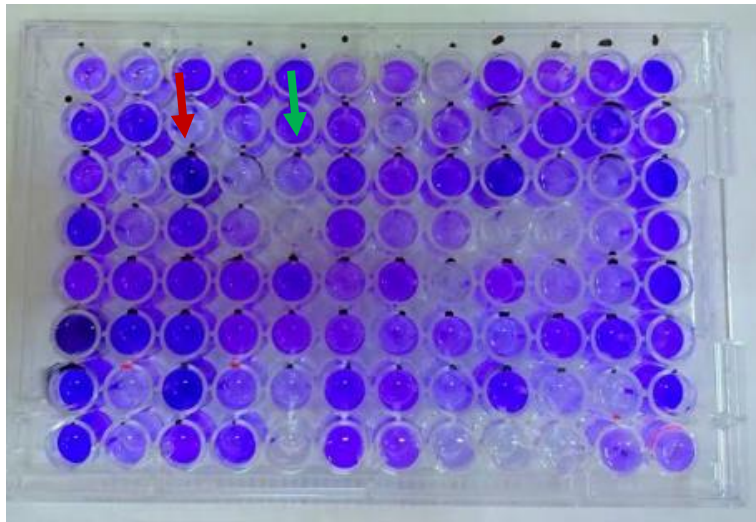


Figure 18: Résultat de la recherche de la formation de biofilm par au cristal violet sur microplaque de 96 puits.

Flèche rouge : biofilm de forte intensité ; **Flèche verte :** Biofilm de faible intensité

Tableau IX : Résultats de la recherche de formation du biofilm par les souches d'entérobactéries, selon l'intensité

Effectif (n)	Intensité du biofilm formé (n ;%)		
	Faible DO < 0.1	Moyenne 0.1 < DO < 0.5	Forte DO > 0.5
40	0 ; 0%	10 ; 25%	30 ; 75%

De nombreuses études mettent l'accent sur le problème que constitue le développement d'une telle structure dans la pathogénèse des infections, notamment chez le cancéreux. En effet, ce mode d'organisation promeut la persistance des bactéries dans un biofilm et donc l'établissement d'infections chroniques. Au sein de ce biofilm, les bactéries sont protégées de l'action des antibiotiques et des défenses de l'hôte. Elles communiquent plus facilement par le quorum sensing afin d'induire l'expression des gènes de virulence. Chez les individus atteints de cancer, le risque lié à la formation de biofilm est plus important. En effet, ces patients sont souvent sondés, cathétérisés ou portant une prothèse ; c'est autant de surface abiotiques adhésive permettant la fixation, la colonisation et la formation de ces tissus bactériens.

Le pouvoir hémolytique a été recherché chez les entérobactéries, mises en évidence dans notre étude, en les cultivant en présence d'érythrocytes humains. Ce pouvoir est dû à l'expression de cytolysines de type hémolysines par de nombreuses espèces d'entérobactéries dont *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli*. Les résultats de cette recherche montrent que toutes les souches provoquaient une hémolyse à différentes intensités (**Figure 19 et tableau VII en annexe 6**).

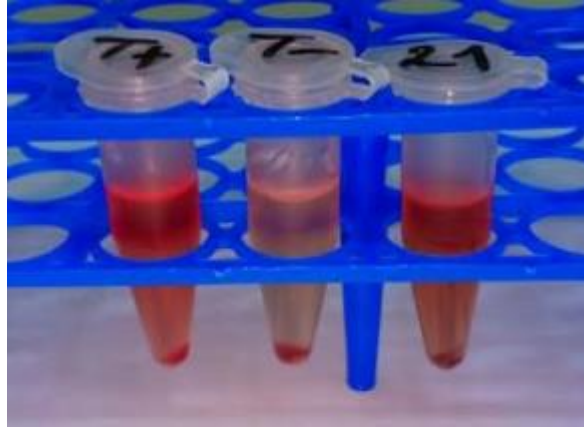


Figure 19 : Activité hémolytique d'une souche d'*E. coli*.

Témoin positif : Erythrocytes + eau distillée ; **Témoin négatif** : Erythrocytes + PBS.

Les cytolysines contribuent fortement à la virulence bactérienne. Leur libération permet aux bactéries d'adhérer aux composants de la MEC et d'envahir les tissus profonds de l'hôte. Les cytolysines induisent une altération de la membrane plasmique et des endo-membranes de nombreuses cellules, particulièrement les cellules de l'immunité. En cas de phagocytose, les bactéries productrices de ces toxines sont capables d'échapper à l'action des enzymes lysosomiales, en lysant la membrane du phagolysosome.

Parmi les cytolysines, nous retrouvons les toxines formant des pores ou « PFT » (Pore Forming Toxine) dont les hémolysines (**Geny et Popoff, 2006**). Il existe plusieurs hémolysines : α , β et γ -hémolysine. L' α -hémolysine est par exemple produite par les souches uropathogènes d'*E. coli* et certaines souches de *K. pneumoniae*. L'action de l'hémolysine α permet de rendre disponible le fer nécessaire pour la croissance bactérienne en libérant le fer piégé dans les cellules de l'hôte. Une fois sécrétées dans l'organisme hôte, les hémolysines peuvent provoquer des effets variables. Leur liaison aux membranes cellulaires peut conduire au déclenchement de l'apoptose, à la perturbation des défenses immunitaires non-spécifiques et spécifiques et à de graves dysfonctionnements physiologiques (**Alouf, 2000**).

L'hémolysine Sh1A de *Serratia marcescens* est largement décrite dans la littérature. Elle provoque l'hémolyse des érythrocytes et conduit à la libération de médiateurs inflammatoires, tels que l'histamine et les leucotriènes. Sh1A s'intègre dans la membrane des érythrocytes et

provoque la lyse osmotique par la formation des canaux (Grimont et Grimont, 2006 ; Golemi-Kotra, 2008).

III. 2. Recherche des facteurs de virulence spécifiques :

Le phénotype d'hypermucoviscosité (HMV) a été recherché pour les souches de *K. pneumoniae*. Les résultats montrent qu'aucune souche n'était HMV+. Nous nous attendions à ce résultats, car ce phénotype est, généralement, décrits chez des souches cliniques hypervirulentes de *K. pneumoniae* de sérotypes capsulaires K1 et K2 principalement dans le Sud-Est asiatique. Dans ces pays, ces souches sont à l'origine d'un syndrome invasif avec des taux de morbidité et mortalité importantes (Tsai et al., 2008).

La prodigiosine est un pigment produit par les souches appartenant à l'espèce *S. marcescens*. Quand ce pigment est produit, les colonies sont rouges. Dans notre collection, nous ne possédons que 2 souches de *S. marcescens* et aucune d'elles n'étaient productrices de prodigiosine, comme nous pouvons l'observé dans la **figure 20**. Nous pouvons aussi remarquer le phénotype « swarming » caractéristique de certaines souches de *S. marcescens*.

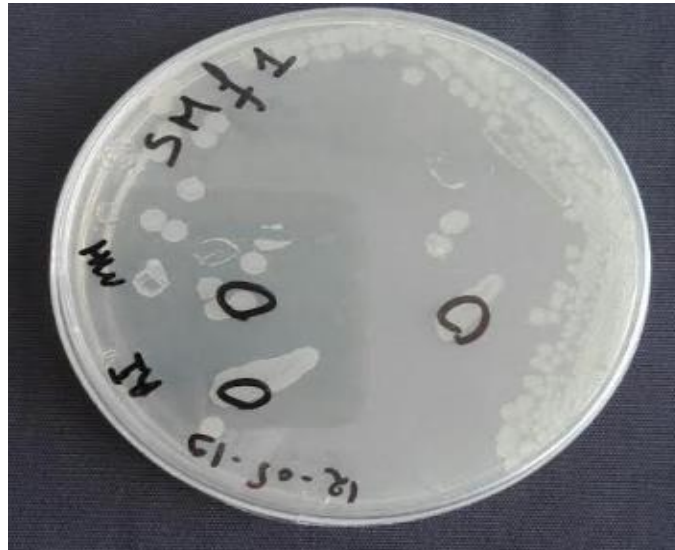


Figure 20 : Culture de *S. marcescens* sur gélose Muller Hinton révélant des colonies blanchâtres qui poussent selon un mouvement de « swarming ».

La Prodigiosine est un métabolite secondaire de couleur rouge produit principalement par la bactérie *Serratia marcescens*. Cette molécule présente des activités antitumorales, immunosuppressives, antibiotiques, antifongiques et antipaludiques. La production de ce

pigment est dépendant de nombreux facteurs, qui limitent de façon importante sa mise en évidence en laboratoire. Parmi ces facteurs nous retrouvons essentiellement le milieu de culture, leur pH et la température d'incubation (**Darshan et Manonmani, 2015**). Il fut rapporté que les souches produisant la prodigiosine sont généralement environnementales, possédant moins de pouvoir de pathogénicité et étant plus sensibles aux antibiotiques. Toutefois, il est important de noter que l'espèce *S. marcescens* est naturellement résistante à la colistine (Vérifiée dans notre étude) (**Grimont et Grimont, 2006**).

La recherche de la capsule polysaccharidique par la méthode de contre coloration à l'encre de Chine à l'état frais a révélé, pour les espèces : *Klebsiella pneumoniae* (n=10), *K. oxytoca* (n=1) un cytoplasme homogène coloré en noir entouré d'un halo lumineux ; il s'agit de la capsule. Cette recherche fut laborieuse pour les souches d'*Escherichia coli* (n=10) et *Serratia marcescens* (n=2) et nous ne pouvons affirmer la présence de la capsule à leur surface.

Les bactéries à Gram négatif peuvent produire et exporter divers polysaccharides dont ceux composant la capsule (**Yuan et al., 2013**). La majorité des souches de *K. pneumoniae* produisent une capsule polysaccharidique particulièrement celles d'origine clinique. Nos résultats sont en accord avec ceux de **El Fertas-Aissani et al. (2011)**. Actuellement, plus de 77 différents antigènes capsulaires ont été identifiés chez *Klebsiella* ; certains sont plus virulents que d'autres (K1 et K2) (**Clegg et Murphy, 2016**). La colonisation des muqueuses d'un individu souffrant d'un cancer par des klebsielles, le prédispose à des septicémies dont le traitement sera plus difficile à mettre en place du fait, aussi de la multirésistance de ces souches.

III. 3. Recherche du potentiel de pathogénicité chez *S. marcescens* :

A la lumière des résultats obtenus dans ce volet, nous constatons que l'ensemble des souches d'entérobactéries, que nous avons isolés chez les patients cancéreux, présentent un potentiel de virulence certain. En plus des niveaux de résistance élevés que nous avons observé, il semblerait aussi que ces bactéries sont capables de survivre dans le sang du fait de leur résistance au puissant système du complément. De plus, par leur capacité à former un biofilm, ces bactéries sont protégées contre les défenses de l'hôte (déjà affaiblies chez le cancéreux), elles peuvent persister et disséminer dans tout l'organisme hôte.

Ce potentiel de virulence a été mis à l'épreuve, pour l'espèce *S. marcescens*, en tenant d'induire un sepsis dans un modèle murin utilisant des souris BLAB/C. Après avoir déterminé

la dose létale 50 (DL50), une dose sub-létale fut injectée en intrapéritonéale chez ces souris, sacrifiée 24h après. Les résultats de l'estimation de la DL50 chez une souche de *S. marcescens* sont illustrés dans la **figure 21**.

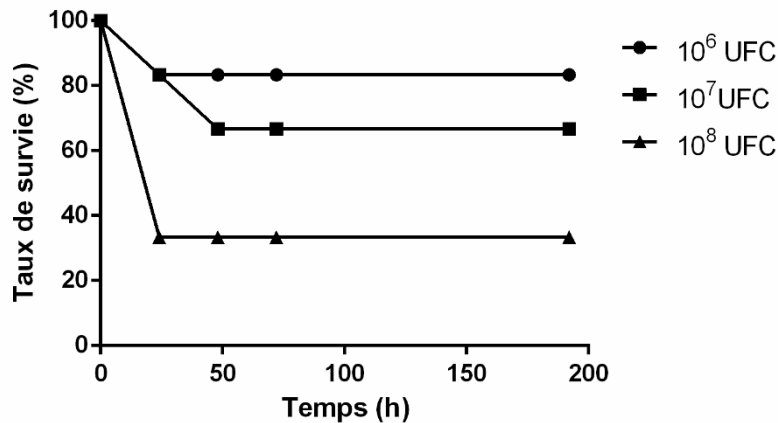


Figure 21: Taux de survie des souris BALB/c au sepsis induit par différentes doses de *Serratia marcescens*.

Le nombre total des animaux dans chaque groupe est de 6. L'injection de différentes doses de *S. marcescens* 10⁶, 10⁷, et 10⁸ UFC/100μL montre une mortalité de 16,66% à 10⁶UFC/100μL, de 16,66% à 10⁷UFC/100μL et de 66,66% à 10⁸UFC/100μL après 24h. Le taux de mortalité augmente à 33,33% pour la dose de 10⁷UFC/100μL alors qu'aucun changement n'a été observé pour les 2 autres doses 10⁶ et 10⁸ UFC/100μL. La DL50 a été estimée entre 10⁷ et 10⁸UFC/100μL. La dose choisie est une dose sub-létale de 10⁶UFC/100μL. La DL50 que nous avons obtenu est plus faible comparés à celle de **Horri et al. (1998)**, **Lin et al. (2010)**, **Anderson et al. (2017)** et **Srinivasant et al. (2017)**. Ceci indique que notre souches pourrait être plus virulente, puisque des doses plus faible induisent une mortalité.

Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Iwaya et al. (2005)** et **Rebout et al. (2017)** qui indiquent les mêmes DL50 pour des souches cliniques de *S. marcescens*. Ces auteurs ont réalisé des modèles murins de sepsis ou d'infections pulmonaires induites. Le sepsis ainsi développé a conduit à de multiples lésions tissulaires. Ils ont observé souvent dans les tissus de l'hôte une forte infiltration par les neutrophiles, une hémorragie des nécroses et des ischémies. De plus, sur le plan biochimique, une augmentation significative des marqueurs inflammatoires (MPO, NO, TNFα...) et une diminution des marqueurs anti-inflammatoires (GSH...) est observée, indiquant une réponse inflammatoire aigue pouvant

conduire à des rapidement à de multiple défaillances viscérales et fatalement au choc septique.

Les germes isolés des centres anti-cancer présentent des caractéristiques de résistance extrêmement inquiétantes et qui ont rapidement évolué vers la multirésistance. Cette dernière touche aussi les antibiotiques dits de « réserve ». Cette résistance est due à des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques dont le support génétique est souvent transférable. La transmission de ces nouveaux traits génétiques est facilitée par la pression de sélection que subissent ces bactéries dans les milieux hospitaliers ; d'une part, et d'autre part, par la stabilité des structures génétiques, dont les plasmides, qui portent cette résistance.

Une nouvelle donnée semble émergée concernant ces bactéries causant des infections chez le patient cancéreux. En plus de la multirésistance aux antibiotiques, un potentiel de virulence, non négligeable, parmi les souches isolées, a été révélé dans notre étude. L'association résistance/virulence a déjà été décrites dans des études sur les infections nosocomiales et communautaires, nous citons celles de **Sahly et al. (2008)**, **Ivanova et al. (2012)**, **El Fertas-Aissani et al. (2013)**, **Bialek-Davenet et al. (2014)** et **Li et al. (2014)**. Toutefois, nos recherche bibliographiques concernant cette association chez les bactéries isolées des personnes atteintes de cancer, était infructueuse. De ce fait, nous n'avons pas pu corroborer nos résultats.

Les travaux dans ce domaine ont montré que l'acquisition de BLSE, par exemple, augmente les capacités de virulence des souches, du fait de la localisation des gènes de résistance aux antibiotiques sur des plasmides codant des facteurs de virulence. Ces plasmides peuvent aussi porter des gènes non pas de virulence mais de régulateurs transcriptionnels qui augmentent la virulence (**Sahly et al., 2008**).

Notre travail a pour objectif la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence potentielle des souches bactériennes à l'origine d'infections chez les cancéreux suivis à l'hôpital de Frantz Fanon Blida. Les résultats épidémiologiques des prélèvements ont montré que :

- 81(39,9%) des prélèvements étaient positifs, ils étaient plus nombreux chez les hommes comparés aux femmes avec un taux de 58%. Nous avons aussi noté la prédominance des prélèvements de pus.
- La majorité des patients étaient leucémiques et sous traitement anti-cancéreux.

A l'issue des cultures bactériennes, nous avons pu identifier 111 souches, à partir du pus pour la majorité d'entre elles. Nous avons remarqué que :

- Les bacilles à Gram négatif étaient plus fréquents (69.36%) que les cocci à Gram positif.
- Les Entérobactéries étaient majoritaires parmi les Gram négatif, alors que c'est *Staphylococcus aureus* qui l'était pour les Gram positif.
- Les souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ont été mises en évidence elles représentaient 4.85% de l'ensemble des souches identifiées.

Ces germes étaient résistants à plusieurs familles d'antibiotiques : les β -lactamines : Ampicilline (56.19%), les aminosides : Gentamicine (24.27%), les macrolides et apparentés : Erythromycine (11.65%), les quinolones, les tétracyclines, les sulfamides et association. Nous avons aussi constaté :

- 29.12% de souches BLSE parmi les entérobactéries
- 75 profils de résistance différents et de diverses origines.
- 47.74% des souches étaient multirésistantes ou MDR résistantes, dont les profils de résistance étaient variés. La multirésistance a été observée dans la majorité des cas chez les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae*.
- La majorité des souches MDR ont été identifiées à partir du pus (18.01%) et du sang (11.71%).

Conclusion et Perspectives

L'étude de la virulence n'a concerné que les souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les facteurs de virulence communs à ce groupe bactérien étaient exprimés par l'ensemble des souches, alors que les facteurs spécifiques étaient restreints à certaines souches seulement. Le pouvoir pathogène recherché pour une seule espèce, *S. marcescens*.

Une association résistance/virulence, parmi les souches isolées des patients cancéreux, a été mise en évidence dans notre étude. Cette situation est particulièrement dangereuse pour ces patients connaissant leur fragilité, l'étendue des lésions produites des suites de la chimiothérapie, et les différentes maladies sous-jacentes associées à leur cancer.

En perspectives à ce travail, nous pourrions caractériser sur le plan génétique la résistance et la virulence de ces souches et ce en recherchant les gènes codant ces deux entités. Il serait aussi très intéressant de rechercher le support génétique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence et vérifier si une association physique entre eux peut exister.

Références Bibliographiques

- Actor, J. (2014). Chapitre: Basic Disorders of Immune Function dans Introductory Immunology. eBook ISBN: 9780124200722.
- Alekshun Michael N, Stuart B Levy, 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Leading Edge Review. 1043-0044.
- Alouf, J.E. (2003). Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. Folia Microbiologica. 48: 5-16.
- Aslani A, Smith RC, Allen BJ, Pavlakis N, Levi JA Cancer. 15 février 2000; 88 (4): 796 à 803.
- Astagneau P, Maugat S, Tran-Minh T, Douard MC, Longuet P, Maslo C, et al. Long-term central venous catheter infection in HIV-infected and cancer patients: a multicenter cohort study. Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20:494–8.
- De Bentzmann, S. et P. Plésiat (2011). *Pseudomonas aeruginosa* : une virulence complexe. Revue francophone des laboratoires. N°435.
- Blot, F. (2003). « Pronostic des infections en oncohématologie ». 235-247.
- Cambau, E. et T. Guillard (2012). Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 31: 65-76.
- Cattoir, V. (2012). Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. Revue Francophone Des Laboratoires. 445 : 79-87.
- Chandesris, M., Lanternier, F., Lecuit, M., Lortholary, O. « complications infectieuses des déficits immunitaires ». Praticien. 5T, 15, 1653-1664.
- Claudette, G, Varricchio, I (2004). A Cancer Source Book for Nurses. American cancer society, 383 p, Canada.
- Clegg, S. et C. Murphy (2016) . Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology Spectrum. 4: 1-17.
- Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. Clin Infect Dis 2001; 33: 947–953.
- Crawford J, Dale DC, Lyman GH. Neutropénie induite par la chimiothérapie: Risques, conséquences et nouvelle direction pour sa gestion. Cancer. 2004; 100 : 228–237. doi: 10.1002 / cncr.11882.
- Darshan, N. et H. K. Manonmani (2015). Prodigiosin and its potential applications. J Food Sci Technol 52(9):5393–5407

- François Denis, Marie Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin., 2001. Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed . Elsevier Masson .2^{ème} Edition. 147p.
- Di Sabatino R Carsetti GR. Corazza Post-splenectomy and hyposplenic states. Lancet 2011 (378).
- Donnenberg, M. S. (2015). Chapitre: Enterobacteriaceae dans Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. Pages: 2503-2516.
- Doorduijn, D. J., S. H.M. Rooijackers, W. Van Schaik et B. W. Bardoel (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. Immunobiology. 1-8.
- Edgren G, Liang L, Adami H-O, Chang ET. Enigmatic sex disparities in cancer incidence. Eur J Epidemiol 2012;27:187-96.
- Fierer, J., F. Finley et A. I. Braude (1972). A plaque assay on agar for detection of Gram-negative bacilli sensitive to complement. Journal of Immunology. 109:1156–1158. (Foster, 1996)
- Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA et coll. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2011 ; 52 (4) : e56-e93.
- Gafter-Gvili A, Fraser A, Paul M, Vidal L, Lawrie TA, van de Wetering MD, Kremer LCM, et Leibovici L (2012). Antibiotic prophylaxis for bacterial infections in afebrile neutropenic patients following chemotherapy. The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons.
- GBD 2015 Risk Factors Collaborators (2015). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study.
- Geny, B. et M. R. Popoff (2006b) . Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. Biology of the Cell. 98:667-678.
- Goyette, M. (2012). La neutropénie fébrile. Le Médecin du Québec, volume 47, numéro 10.
- Girmenia, C. et F. Menichetti (2011). Current Epidemiology and Prevention of Infectious Complications in Cancer Patients. Neutropenia and Infections. European Oncology & Hematology
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft- versus - leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 1990; 75: 555–62.

- Howlader., 2017. Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance Epidemiology and End Results Program (1992-2003.)
- Iredell, J., J. Brown et K. Tagg (2015). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*. 351:h6420.
- Jones ME, Karlowsky JA, Dragui DC, Thornsberry C, Sahm DF, Nathwany D. 2003. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA AND Europe : a guide to appropriate antimicrobial therapy. *International journal of Antimicrobial agents* (22) 406-419
- Krause, K. M., A. W. Serio, T. R. Kane et L. E. Connolly (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6: a027029
- Labourey J-L , P Lacroix , Genet D , et al. Complications thrombotiques de dispositifs d'accès veineux central implantés: une évaluation prospective .*Cancer du taureau*. 2004 ; 91 : 431 - 436 .
- Leclercq B, Bussy C, Blot F. Infections nosocomiales en oncohématologie. In: Avril JL, Carlet J, editors. *Les infections nosocomiales et leur prévention*. Paris: Ellipses,; 1998. p. 323–45.
- Leke L, Saygili A, Vural M, Risbourg B. Malnutrition and immunodeficiency in children. *Arch Pediatr* 1996, 3 : 705-713.
- Limeres, J., P. Diz Dios et C. Scully (2017). Chapitre : Systemic Bacteria Transmissible by Kissing dans *Saliva Protection and Transmissible Diseases*.
- Livermore, D. M (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiolog Reviews*. 8: 557-584.
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*. 14: 3-10.
- Maldonado, N. C., C. Silva de Ruiz, M. Cecilia, M. E. Nader-Macias (2007). A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. 1: 52-9.
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999 (20).
- Merens Audrey, 2011 . *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance . revue francophone des laboratoires . volume 2011(49-62).

- National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines. Version 2.2011. Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections. Site Internet www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
- Oliveira, AL., M de Souza, VMH Carvalho-Dias, MA Ruiz, L Silla, P Yurie Tanaka, BP Simoes, P Trabasso, A Seber, CJ Lotfi, MA Zanichelli, VR Araujo, C Godoy, A Maiolino¹, P Urakawa, CA Cunha, CA de Souza, R Pasquini et M Nucci¹ (2007). Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* (2007) 39, 775–781.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-686.
- Pantosti A, Sanchini A, Monaco M., 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *staphylococcus aureus*. *future medicine*. 3(23).
- Peleg, A. Y., M.B., B.S., M.P.H. et David C. Hooper, M.D (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*. 2010 May 13; 362(19): 1804–1813
- Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *N Engl J Med* 1993 ; 328 (18) : 1323-32.
- Potter M. New anti-cancer therapies, new opportunities for infection. *Curr Opin Infect Dis* 1999;12:359–63.
- Ramirez, M. S., G. M. Traglia, D. L. Lin, T. Tran et M. E. Tolmasky (2014). Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiology Spectrum*. 5: 1-15.
- Rodriguez-villalobos, H. et M. J. Struelens (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu. *Réanimation* 15 (2006) 205–213
- SHRONTZ EP. Basic concepts of immunology and its application to clinical nutrition. *Nutr Clin Pract* 1993, 8 : 177-183.
- Tattevin, P. (2011) Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d'acquisition communautaire. *Médecine et maladies infectieuses* 41 (2011) 167–175.

- Vincenot, F., Saleh, M., & Prévost, G. (2008). *Les facteurs de virulence de Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2008(407), 61– 69. doi:10.1016/s1773-035x(08)74868-8.

Annexe 1

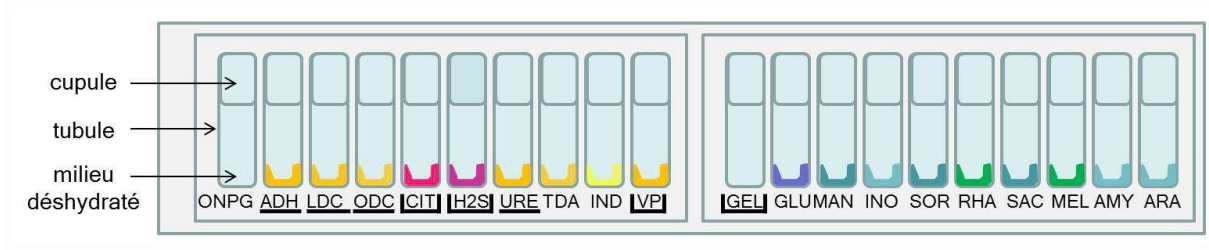
I.2 Le matériel non biologique :

Appareillage	Utilisation
Étuve	Incubation des boîtes ensemencées, flacons d'hémoculture pour les systèmes manuels, galeries API
Jarre	Incubation des boîtes ensemencées dans une atmosphère riche en CO ₂
Automate Bactec	Incubation des flacons d'hémoculture
Centrifugeuse	Centrifugation des échantillons
Spectrophotomètre	Mesure de la densité optique des suspensions
Milieux de culture	Utilisation
Gélose nutritive (GN)	Culture des germes non exigeants
(BCP)	Culture des entérobactéries
Gélose au sang cuit / Gélose au sang frais (GSC/ GSF)	Culture des germes exigeants
Bouillon cœur cerveau / Bouillon glucosé tamponné (BHIB/ BGT)	Milieux d'enrichissement
Luria Bertani LB	Milieu favorisant l'expression des facteurs de virulence
Réactifs	Utilisation
Eau oxygénée	Identification des Gram+ (catalase)
Réactif latex test	Identification des staphylocoques
Réactifs de groupage antigénique (A B C D F G)	Identification des streptocoques
Oxydase	Identification des Gram -
TDA	Test TDA API20E, API20NE
JAMES	Test IND API 20E, API20NE
VP1, VP2	Test VP 20E API Staph API Strep
NIT 1 NIT2	Test NO ₂ API 20NE, API Staph
ZYM A, ZYM B	Test PAL API Staph API Step
NIN	Test HIP API Strep
Autres	Utilisation
Disques d'antibiotiques	Antibiogramme
Bandelettes E test	Mesure de CMI

Annexe 1 :

Caractéristiques de la galerie API :

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



- Après purification des colonies bactériennes, préparer une suspension bactérienne puis en verser dans chacun des tubules de la galerie.
- Remplir la cupule pour les substrats dont le nom est encadré (CIT, VP...). L'objectif est de réaliser des tests en aérobiose (riche en oxygène).
- Remplir la cupule avec de l'huile de vaseline pour les substrats dont le nom est souligné (ADH, LDC...). Cette huile empêche le contact avec l'oxygène, créant ainsi un milieu anaérobique (absence d'oxygène) et empêche également les composés volatiles synthétisés lors de la réaction de s'échapper du tube.
- Incuber la galerie pendant 18 à 24h à température adaptée.
- Après incubation, regarder si la réaction est positive ou négative pour les tests spontanés, et selon les recommandations ajouter des réactifs pour les tests restants.

Annexe 2

Un prélèvement réalisé en toute asepsie, accompagné d'une fiche de renseignements du patient, et acheminé rapidement au laboratoire constitue la clé du diagnostic

Fiche de renseignements cliniques :

Elle est primordiale, elle accompagne obligatoirement tout prélèvement destiné à une analyse microbiologique, elle doit comprendre :

- Le nom et le prénom.
- L'âge et le sexe.
- Si le malade est hospitalisé, le nom du service.
- Date du prélèvement.
- Nature du prélèvement.
- Les renseignements cliniques.

Démarche diagnostique :

Afin de réaliser notre étude, nous avons effectué plusieurs méthodes qui ont abouti à la caractérisation phénotypique de bactéries responsables d'infections survenant chez les cancéreux, ensuite la résistance aux antibiotiques de ces souches, et enfin leurs profils virulence.

La démarche diagnostique pour traiter les multiples prélèvements débute par des étapes communes aux différents types de prélèvements, ce qui diffère est la mise en culture.

- **Examen macroscopique :**

Noter l'aspect limpide ou trouble, la couleur, la présence d'une hématurie, l'odeur cela dépend du type de prélèvement.

- **Examen microscopique :**

Il représente une étape fondamentale du diagnostic bactériologique. On distingue :

- **L'examen cytologique :**

Il permet d'apprécier la réaction inflammatoire et de la chiffrer par mm³ de prélèvement, et de préciser le caractère des cellules inflammatoires (lymphocytes ou polynucléaires, altérées ou non altérées).

L'analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (urines, liquides pleuraux, etc.). La quantification des éléments est effectuée manuellement en faisant appel à des cellules réutilisables comme les Nageotte ou Malassez.

Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été mise en évidence. la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

- **L'examen à l'état frais :**

- Prélèvement reçu sur un écouvillon (prélèvement de gorge, pus, buccal, nasal, auriculaire, anal et génital) :

Technique :

L'examen microscopique des prélèvements consiste à étaler l'écouvillon après avoir ajouté un bouillon d'enrichissement sur une lame propre, couvrir d'une lamelle et observer sous microscope photonique grossissement 10x40.

Cet examen a donc une forte valeur pour le choix des milieux d'isolement et permet de déterminer : la présence ou l'absence de bactéries (une ou plusieurs espèces), leur morphologie, leur position intra ou extracellulaire, l'espèce dominante (prélèvement polymicrobien), leur abondance.

❖ **Hémoculture : incubation des flacons**

- **Système manuels** : le flacon est incubé à 35°C pendant 10jours avec lecture après 24h, J5, J7 et J10,
- **Système automatisé** : le flacon est incubé dans le bactec pendant 5jours à 35 °C sous agitation douce dans les automates. Lors de sa croissance, la bactérie produit du CO₂ induisant soit une baisse du pH, qui sera détectée par l'automate à l'aide d'un sensor, par fluorescence rouge signe d'une culture positive ou verte pour signaler l'absence de germes dans le prélèvement

❖ **Urines : interprétation**

Tableau : Interprétation des résultats de la numération de germes :

Nombre de germes N	Interprétation des résultats de la numération
$N < 10^3$ /ml	Pas d'infection urinaire
$N > 10^5$ /ml	Présence d'infection urinaire
$10^4 < N < 10^5$ /ml	Interprétation douteuse, il faut refaire l'examen, respecter les conditions de prélèvement et tenir compte des renseignements cliniques

- **Protocole de la coloration de Gram :**

Technique :

- Déposer une goutte d'eau distillée sur une lame propre.
- Prélever une petite colonie bien isolée et la déposer sur la goutte puis l'étaler.
- Fixer à la flamme du bec bunsen.
- Verser à la surface de la lame le violet de gentiane, laisser le pendant 1mn.
- Rincer à l'eau.
- Recouvrir la lame par la solution de Lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Décoloration par l'alcool qui traverse bien la paroi des bactéries à Gram négatif.
- Rincer à l'eau.
- Recolorer par la fuschine, et laisser agir pendant 1 mn.
- Rincer à l'eau et sécher la lame.
- Mettre une goutte d'huile à immersion et observer au microscope optique à grossissement $\times 100$.

Lecture :

Les bactéries à Gram positifs conservent la coloration violette et ne se décolorent pas sous l'action de l'alcool tandis que les bactéries à Gram négatif se décolorent rapidement et elles sont colorées par la fuschine et apparaissent de couleur rose.

Annexe 3 :

Identification des *Streptocoques* :

❖ **Colonies Alpha-hémolytique (hémolyse partielle) :** présomption de *Streptococcus pneumoniae*.

➤ **Recherche de l'antigène de capsule (slidex pneumo-Kit) :**

Pastorex™ Meningitis : est un test d'agglutination pour l'identification rapide et précise du *Streptococcus pneumoniae*.

Mode d'emploi :

- On dépose une goutte du réactif dans le cercle de la carte d'agglutination qui doit être noire pour une observation meilleure.
- A l'aide d'une pipette Pasteur on prélève une colonie bien isolée et on mélange bien à l'aide d'un bâtonnet sur toute la surface du cercle.
- Remuer lentement la carte **pendant 5 minutes**.
- Observer l'apparition d'agglutination visible à l'oeil nu dans un délai maximum de 5 minutes. Ne pas conclure à un résultat négatif avant les 5 minutes.

➤ **Test de sensibilité à l'optochine :**

Un test à l'optochine, utilisé pour différencier les pneumocoques des autres *streptocoques* hémolytiques

Principe :

S. pneumoniae est sensible à l'optochine, tous les autres Streptocoques sont résistants.

Technique :

- Ensemencer le milieu de culture avec la souche à tester (technique des quadrants)
- A l'aide d'une pince flambée et refroidie, déposer un disque imprégné d'optochine dans la partie la plus dense de l'isolement, à 1.5 cm du bord de la boîte.
- Incuber 24 H à 37 °C.

Lecture :

- Culture autour du disque d'antibiotique ou zone d'inhibition peu importante : les bactéries sont résistantes à l'optochine
- Zone d'inhibition autour du disque > 12 mm : les bactéries sont sensibles à l'optochine

- ❖ **Colonies Béta-hémolytique (hémolyse totale) :** présomption de *Streptococcus A, B, C, D, G, F.*

➤ **Groupage antigénique :**

Le test Pastorex™ Strep

Le test Pastorex™ Strep est un test d'agglutination rapide pour le groupage des streptocoques selon la classification de Lancefield. Le test comporte des suspensions de latex spécifiques permettant d'identifier les groupes A, B, C, D, F et G.

L'identification des antigènes spécifiques de groupe par des antisérums homologues nécessite une extraction enzymatique préalable

Protocole :

- **Préparation de l'extraction :**
 - Déposer 300 µl de suspension d'enzyme d'extraction dans un tube à hémolyse pour chaque souche isolée à tester.
 - En utilisant une anse, émulsionner avec précaution 5 à 10 colonies d'une culture fraîche de streptocoques dans la solution enzymatique de manière à obtenir une suspension homogène. Si le diamètre des colonies est inférieur à 0,5 mm, augmenter l'inoculum jusqu'à l'obtention d'un trouble visible à l'œil nu.
 - Incuber soit pendant 15 à 45 minutes à température ambiante (18-30°C), soit 10 à 30 minutes à 37°C.
- **Procédure de groupage à partir d'une gélose Columbia au sang ou gélose Columbia ANC :**
 - Déposer 40 µl de solution d'extrait sur chaque cercle de la carte d'agglutination.
 - Agiter lentement les réactifs. En maintenant le flacon compte-gouttes à la verticale, déposer une goutte de chacun des réactifs A, B, C, D, F et G à côté de la suspension, sur la carte d'agglutination.
 - A l'aide d'un bâtonnet mélangeur, mélanger la goutte de latex avec la suspension sur toute la surface du cercle en changeant de bâtonnet entre chaque réactif de latex.
 - Agiter lentement la carte, horizontalement, **pendant 1 minute maximum.**
 - Observer si une agglutination visible à l'œil nu se forme dans un délai **d'1 minute maximum.** La taille des agglutinats et la rapidité de leur apparition dépendent de la concentration antigénique de la suspension d'extrait.

❖ **Galerie API 20E :**

Préparation de la galerie :

- réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau physiologique dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- sortir la galerie de son emballage individuel
- placer la galerie dans une boîte d'incubation

Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette pour éviter la formation de bulles au fond des tubes
- poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant :
 - pour les tests : CIT, VP, GEL remplir tube et cupule,
 - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leurs cupules d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'inoculation et l'incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture

Noter sur la fiche le résultat des réactions spontanées et ajouter des réactifs aux autres tests

- **Test TDA :** 1goutte de réactif TDA ; une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive
- **Test IND :** 1goutte de réactif JAMES ; une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive
- **Test VP :** Test VP : une goutte VP1 et VP2, une couleur rose attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats.

Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Les tests négatifs sont toujours codés 0 alors que le code affecté aux tests positifs varie selon la position du test dans le triplet : 1 pour le premier test, 2 pour le second, 4 pour le troisième. Les 3 résultats du triplet sont additionnés et forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspond au profil biochimique du micro-organisme étudié sur la base des données *AP web*.

La comparaison de ce code à ceux référencés dans la base de données gérée par Biomérieux permet en général d'identifier ce micro-organisme. Si le code numérique obtenu ne figure pas dans cette base de données, il peut s'agir d'un profil ou d'un micro-organisme non référencé, un problème technique (inoculum non respecté, paraffine oubliée, réactifs périmés, etc.) ou une mutation lors du développement bactérien.

❖ **API 20 NE :**

Après préparation de la galerie :

Inoculation de la galerie :

- introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une même pipette tout en évitant la formation de bulles d'air
 - pour le test CIT : remplir tube et cupule
 - pour les autres tests remplir uniquement les tubes
 - pour les tests LDC ODC H₂S URE : créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine
- refermer la boîte d'incubation
- incuber à 37°C pendant 24h

Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture

Noter sur la fiche le résultat des réactions spontanées et ajouter des réactifs aux autres tests

- **Test TDA :** 1 goutte de réactif TDA ; une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive
- **Test IND :** 1 goutte de réactif JAMES ; une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive
- **Test NO₂ :** 1 goutte NIT1, NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes une coloration rouge indique une réaction positive
- l'identification est obtenue à partir du profil numérique

Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données : à l'aide d'un catalogue analytique, rechercher le profil numérique dans la liste des profils. A l'aide du logiciel **apiweb**™, entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

❖ **API Staph :**

C'est un système standardisé pour l'identification des genres : Staphylocoques, Microcoques, comprenant des tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Après préparation de la galerie :

Préparation de l'inoculum :

- ouvrir une ampoule d'API Staph Medium
- préparer une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0.5 McFarland.
Utiliser préférentiellement des cultures jeunes 18- 24h. cette suspension doit être utilisée extemporanément

Inoculation de la galerie :

- à l'aide d'une pipette remplir les tubes de la galerie API Staph Mediumensemencé.
Ne remplir que les tubes et non les cupules sans dépasser le niveau du tube p
- pour éviter la formation de bulles d'air, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule
- créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe
- refermer la boîte d'incubation
- incuber à 37°C pendant 18-24h

Lecture et interprétation :

Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant goutte de chacun des réactifs suivants :

- **Test VP :** VP1 VP2 : Attendre 10 minutes, une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose clair obtenue après 10 minutes doit être considérée négative
- **Test NIT :** NIT 1 NIT 2 .Attendre 10 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive
- **Test PAL :** ZYM A, ZYM BAttendre 10 minutes une coloration violette indique une réaction positive
- l'identification est obtenue à partir du profil numérique

Elle est réalisée à partir de la base de données : à l'aide d'un catalogue analytique, rechercher le profil numérique dans la liste des profils .A l'aide du logiciel **apiweb**™, entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

❖ **API Strep :**

C'est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèces pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Après préparation de la galerie :

Préparation de l'inoculum :

- ouvrir une ampoule d'API suspension Medium (2ml)
- à l'aide d'un écouvillon prélever toute la culture préalablement préparée
- réaliser une suspension très dense à une opacité supérieure à 4 McFarland ; cette suspension doit être utilisée extemporanément

Inoculation de la galerie :

- dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles d'air (pour cela incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule)
- pour les tests VP à LAP : environ 100 ul dans chaque cupule
- pour le test ADH remplir uniquement le tube

- dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) : transférer le reste de la suspension, soit 0.5 ml au minimum dans une ampoule de Medium GP. Bien homogénéiser
- répartir cette suspension dans les tubes uniquement
- remplir les tests des cupules soulignées ADH à GLYG avec l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe
- refermer la boîte d'incubation et incuber à 36°C en aérobiose pendant 24h

Lecture et interprétation :

- après incubation, ajoutez les réactifs :
 - **Test VP** : une goutte VP1 et VP2
 - **Test HIP** : 2gouttes de NIN
 - **Test PYRA, α GAL, β GUR β GAL PAL LAP** : 1 goutte de ZYM A et ZYM B
- attendre 10minutes pour lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture
- l'identification est obtenue à partir du profil numérique
 - identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données : à l'aide d'un catalogue analytique, rechercher le profil numérique dans la liste des profils

A l'aide du logiciel **apiweb**TM, entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres

Annexe 4

Tableau III : liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes

Entérobactéries	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	Staphylococcus spp.	Enterococcus spp.
Ampicilline (10µg)	Ticarcilline (75µg)	Ticarcilline (75µg)	Pénicilline (10 UI)	Ampicilline (10µg)
Amoxicilline+acide clavulanique (20/10µG)	Ticarcilline+acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcilline+acide clavulanique (75/10µg)	Oxacilline (CMI seulement)	Amoxicilline+acide clavulanique (20/10µG)
Aztréonam (30µg)	Pipéracilline (100µg)	Pipéracilline (100µg)	Céfoxitine (30µg)	Céfotaxime (30µg)
Céfalotine (30µg)	Céftazidime (30µg)	Céftazidime (30µg)	Amikacine (30µg)	Tétracycline (30µg)
Céfazoline (30µg)	Aztréonam (30µg)	Imipénème (10µg)	Gentamicine (10µg)	Furanes (300µg)
Céfoxitine (30µg)	Imipénème (10µg)	Amikacine (30µg)	Kanamycine (30µg)	Colistine (10µg)
Céfotaxime (30µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Erythromycine (15µg)	Triméthoprime+sulfaméthoxazole
Céftazidime (30µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)	Clindamycine (2µg)	Acide nalidixique (30µg)
Imipénème (10µg)	Tobramycine (10µg)	Nétilmicine (CMI seulement)	Pristinamycine (15µg)/Quinupristine-dalfopristine (15µg)	Composé vibriostatique O/129
Ertapénème (10µg)	Nétilmicine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ofloxacine (5µg)	Chloramphénicol (30µg)
Amikacine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	
Gentamicine (10µg)	Lévofloxacine (5µg)	Doxycycline (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	
Acide nalidixique (30µg)	Fosfomycine CMI	Triméthoprime+sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg)	Chloramphénicol (30µg)	
Ciprofloxacine (5µg)	Colistine (10µg)	Colistine (CMI seulement)	Vancomycine (CMI seulement)	
Colistine CMI			Teicoplanine (30µg)	
Chloramphénicol (30µg)			Rifampicine (5µg)	
Furanes (300µg)			Triméthoprime+sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg)	
Triméthoprime+sulfaméthoxazole			Tétracycline (30µg)	

e (1,25/23,75µg)				
Fosfomycine (200µg)			Acide fusidique (10µg)	
			Fosfomycine IV	
			Composé vibriostatique O/129	

Tableau XI : liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes

<i>Haemophilus spp</i>	<i>N. gonnorrhée</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>S pneumonia</i>	<i>Streptococcus spp</i> groupe <i>viridans</i>	<i>Streptococcus β hémolytique</i>
Ampicilline (10 µg)	Pénicilline (10 UI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (CMI)	Pénicilline (10 UI)
Amoxicilline + acide clavulanique (20/10µg)	Ampicilline (10µ)	Ampicilline (100µg)	Oxacilline (1µg)	Ampicilline (CMI)	Ampicilline (10 UI)
céfotaxime (30µg)	Ceftriaxone (30µg)	Céfotaxime (30µg)/ Céftriaxone (30µg)	Amoxicilline pour autre que LCR (CMI)	Céfotaxime (30µg)	Erythromycine (15µg)
Tétracyclines (30µg)	Tetracyline (30µg)	Rifampicine (5µg)	Céfotaxime (CMI)	Pristanamycine (15µg)/ quinupristine - Dalfopriline (15µg)	Clindamycine (2µg)
Azithromycine (15µg)	Spectinomycine (100µg)	Chloramphénicol (30µg)	Imipénème (CMI)	Tétracycline (30µg)	Pristanamycine (15µg)/ quinupristine - Dalfopriline (15µg)
Acide nalidixique (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5 µg)	Erythromycine (15µg)	Gentamycine (CMI) pour les infections graves	Tétracycline (30µg)
Ciprofloxacine (5µg)		Azithromycine 15µg	Clindamycine 2µg	Vancomycine 30µg	Ofloxacine 5µg
Levofloxacine (5µg)			Quinupristine - Dalfopriline (15µg)	Chloramphénicol (30µg)	Lévofloxacine (5µg)
Chloramphénicol (30µg)			Chloramphénicol (30µg)	Rifampicine (30µg)	Vancomycine (30µg)

Triméthoprim e + sulfaméthoxa zole (1.25/23.75 µg)			Rifampicine (5µg)	Erythromycin e 15µg	Chloramphén icol 30µg
					Gentamicine 500µg
Rifampicine 5µg			Triméthoprim e + sulfaméthoxa zole 1.25/23.75 µg	Ofloxacine 5µg	Rifampicine 30µg
			Vancomycine 30µg	Lévofoxacin e 5µg	
			Levofloxacin e 5µg	Clindamycin e 2µg	
			Doxycycline 30µg		
			Fosfomycine 50µ		
			Gentamicine 5 µg		

E-test :

C'est une technique de détermination de la CMI, validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes.

Milieu :

Il doit être coulé à une épaisseur de 4mm et les géloses doivent être séchées avant l'usage

L'inoculum :

- A partir d'une culture de 24h sur milieu d'isolement, prélever à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée quelques colonies distinctes (3 à 5) et parfaitement identiques
- Décharger dans 10ml d'eau physiologique stérile. La densité de la suspension bactérienne est ajustée à 0,5 Mac Farland ou à une DO entre 0.08 et 0.1.

Ensemencement :

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- Appliquer une pression sur les parois du tube à essai pour éliminer l'excès de la suspension
- Frotter l'écouvillon sur toute la surface du milieu de culture du haut vers le bas en stries bien serrées.
- Répéter l'opération plusieurs fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose
- dans le cas où plusieurs boîtes de Pétri sont utilisées, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois

Dépôt des bandelettes E-test :

- Prélever la bandelette à l'aide de pince bactériologique préalablement flambées au bec bunsen ; le contact avec la pince doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E
- Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant vers les concentrations les plus élevées
- Eviter la formation des bulles d'air entre la gélose et la bandelette. Une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.
- A noter que l'on peut déposer qu'une ou deux bandelettes au maximum par boîte de 90 mm de diamètre
- Incuber les boîtes dans les conditions requises selon la nature de la bactérie testée

Lecture et interprétation :

- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse, dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne, et la bandelette E-test
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lectures correspondantes
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : R, I, S

➤ **Test de confirmation de double disque :**

Ce test est complémentaire au test de synergie puisqu'il confirme la synthèse d'une β -lactamase à spectre élargie par la souche étudiée. Ce test est réalisé devant tous diamètre de céfotaxime CTX<27mm. Le test se fait comme suit :

- A partir d'une culture de 18h, préparer une suspension bactérienne. A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension, frotter la totalité de la surface de la gélose (Muller-Hinton) avec des stries serrées.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération à une distance de 25mm pour les entérobactéries.
- Laisser diffuser les antibiotiques durant une heure à température ambiante, puis remplacer le disque d'AMC par un disque de CTX.
- incubé pendant 18 à 24h

Lecture : Ce test est positif quand le diamètre d'inhibition autour du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération appliqué après diffusion du disque d'AMC est supérieur ou égale à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporines de 3^{ème} génération.

Annexe 5 :

• **Recherche de la résistance des *Staphylococcus spp* à méticilline (l'oxacilline) :**

Pour le genre *Staphylococcus*, seul le disque de Céfoxitine (30µg) doit être testé dans l'antibiogramme standard pour la détection de la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*), le disque d'oxacilline n'étant pas fiable

Les souches de *staphylococcus* méticillino-résistantes sont souvent résistantes à d'autres familles d'antibiotiques

Technique :

- Sur un milieu MH, ensemercer par stries serrées, la souche de *staphylococcus spp* préparée dans une suspension à 0.5 McFarland
- Déposer un disque de FOX 30µg
- Incuber à 37° pendant 18- 24h

Lecture et interprétations :

Pour *Staphylococcus aureus* : $\geq 22\text{mm}$ (*mecA* -) $\leq 21\text{mm}$ (*mecA* +)

Pour SCN: $\geq 25\text{mm}$ (*mecA* -) $\leq 24\text{mm}$ (*mecA* +)

La Céfoxitine est utilisée pour détecter la résistance à l'oxacilline médiée par le gène *mecA*

Les souches *mecA* + sont reportées OXA R et non FOX R

• **Recherche des carbapénémases de classe B d'AMBLER : Métallo-carbapénémases :**

Il s'agit d'enzymes dépendantes du Zn^{++} , et inhibées par l'EDTA, d'origine plasmidique.

Méthodes de détection :

✓ **Inhibition par l'EDTA :**

Déposer 750 μ g d'EDTA (soit d'une solution d'EDTA 0.5 M PH : 8) sur un disque d'imipénème et comparer le diamètre obtenu avec celui d'imipénème seul.

L'EDTA inhibe l'enzyme entraînant une augmentation du diamètre d'inhibition du disque IPM+ EDTA par rapport au disque IPM seul.

✓ **Test de Hodge modifié pour détecter les KPC et les métallo carbapénémases (test du trèfle)**

100% de sensibilité et de spécificité pour détecter les métallo-carbapénémases.

Technique:

- Souche révélatrice E.coli ATCC 25922
- Préparer une suspension bactérienne d'E.coli ATCC 25922 à 0.5 MF dans l'eau physiologique.
- Diluer l'inoculum au $1/10^{\text{ème}}$ (0,5 ml de la suspension de 0,5 MF + 4,5 ml d'eau physiologique).
- Ensemencer une gélose MH par écouvillonnage, laisser sécher 3 à 5 mn.
- Déposer au centre un disque d'ertapénème 10 μ g (ou de méropénème).
- A partir du disque, faire une inoculation en trait avec la souche à tester et avec deux souches de référence (*K.pneumoniae* ATCC BAA-1705 : carbapénémase positive) et (*K.pneumoniae* ATCC BAA-1706 : carbapénémases négative).

Interpretation:

Après 16-24 h d'incubation les souches productrices carbapénémases de type B vont pousser jusqu'au disque d'ertapénème ou méropénème.

-un test de Hodge modifié est positif quand *Escherichia coli* ATCC 25922 au contact d'une souche productrice de carbapénèmase de type B, va pénétrer etb croitre dans le diamètre d'inhibition en donnant un aspect d'invagination de la culture.

Annexe 6

Tableau IV: Résultats de l'identification biochimiques des espèces à partir des prélèvements biologiques

Groupes (n, %)	Espèces (n)
Gram positif (32 ; 28.82)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=15)
	<i>Staphylococcus à coagulase négative</i> (n=1)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=1)
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=2)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=1)
	<i>Streptococcus mitis</i> (n=1)
	<i>Streptococcus groupe D</i> (n=1)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=5)
	<i>Enterococcus faecium</i> (n=2)
	<i>Enterococcus spp</i> (n=2)
	<i>Aerococcus urinae</i> (n=1)
Gram négatif (79 ; 71.17)	<i>Escherichia coli</i> (n=22)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=18)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=2)
	<i>Serratia marcescens</i> (n=2)
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=7)
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)
	<i>Proteus mirabilis</i> (n=4)
	<i>Proteus vulagris</i> (n=1)
	<i>Citrobacter koseri</i> (n=2)
	<i>Citrobacter freundii</i> (n=1)
	<i>Morganella morganii</i> (n=2)
	<i>Providencia stuartii</i> (n=1)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=8)
	<i>Pseudomonas spp</i> (n=2)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=4)
	<i>Haemophilus spp</i> (n=1)
<i>Neisseria spp</i> (n=1)	

Tableau V : Répartition des bactéries isolées selon la nature du prélèvement biologiques.

Type de prélèvement (n)	Gram négatif (n)	Gram positif (n)
Sang (19)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=2)
	<i>Escherichia coli</i> (n=2)	<i>Staphylococcus coagulase négative</i> (n=1)
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=1)
	<i>Citrobacter freundii</i> (n=1)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=1)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=1)
	<i>Pseudomonas spp</i> (n=1)	
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1)	
Cathéter (1)		<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=1)
Pus (53)	<i>Escherichia coli</i> (n=10)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	
	<i>Serratia marcescens</i> (n=2)	
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=3)	
	<i>Proteus mirabilis</i> (n=3)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=13)
	<i>Proteus vulgaris</i> (n=1)	<i>Streptococcus groupe D</i> (n=1)
	<i>Citrobacter koseri</i> (n=1)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=5)
	<i>Morganella morganii</i> (n=2)	<i>Enterococcus faecium</i> (n=1)
	<i>Providencia stuartii</i> (n=1)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=2)		
Urines (4)	<i>Escherichia coli</i> (n=2)	
	<i>Citrobacter koseri</i> (n=1)	/
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)	
Prélèvement buccal (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)	/
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=1)	
Prélèvement anal (16)	<i>Escherichia coli</i> (n=6)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	<i>Aerococcus urinae</i> (n=1)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=1)	<i>Enterococcus spp</i> (n=1)
Prélèvement génital (5)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=1)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)	<i>Entrococcus spp</i> (n=1)
	<i>Escherichia coli</i> (n=1)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=1)	
Liquide d'ascite (2)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=1)	<i>Enterococcus faecium</i> (n=1)
	<i>Escherichia coli</i> (n=1)	
Prélèvement respiratoire (9)	<i>Proteus mirabilis</i> (n=1)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)	
	<i>Pseudomonas spp</i> (n=1)	<i>Streptococcus mitis</i> (n=1)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1)	
	<i>Haemophilus spp</i> (n=1)	
	<i>Neisseria spp</i> (n=1)	

Annexe 7:

Tableau VI : Profils de résistance de l'ensemble des souches isolées

Nombre de familles	Nombre de molécules	Profils de résistance	Souches (n)
1 famille	1	PR 1 : PEN	<i>S aureus</i> 119 <i>S aureus</i> 268 <i>S aureus</i> 481 <i>S aureus</i> 521 <i>S aureus</i> 251
		PR 2 : AM	<i>Kp</i> 268 <i>Kp</i> 340
		PR 3 : TET	<i>Enterococcus spp</i> 500 <i>A baumannii</i> 377
		PR 4 : SXT	<i>E coli</i> 448
		PR 5 : CS	<i>P mirabilis</i> 448 <i>P mirabilis</i> 624
		PR6 : CIP	<i>E coli</i> 624 <i>Enterococcus faecalis</i> 653
		2	
PR 8 : AM CTX	<i>Streptococcus groupe D</i> 565		
PR9 : LVX CIP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 703		
PR10 : GM NET	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 450		
3		PR11 : AM AMC CZ	<i>Enterobacter cloacae</i>

			676 <i>E coli</i> 704 <i>Enterobacter cloacae</i> 324 <i>Citrobacter koseri</i> 588
		PR 12 : TIC TCC PIP	<i>P aeruginosa</i> 605
		PR13 : PEN OX ₁ FOX	<i>S aureus</i> 391
	4	PR 14 : AM AMC CZ CTX	<i>E coli</i> 548 <i>E coli</i> 343 <i>E coli</i> 674
		PR 15 : AM AMC CZ FOX	<i>Enterobacter cloacae</i> 251*
	5	PR 16 : AM AMC CTX ETP	<i>Enterobacter cloacae</i> 46
2 familles	2	PR 17 : PEN CIP	<i>S aureus</i> 476
		PR18 : GM CIP	<i>P aeruginosa</i> 629
		PR 19 : PEN FA	<i>S aureus</i> 724
		PR 20 : AM E	<i>Streptococcus mitis</i> 70
		PR 21 : AM RA	<i>Haemophilus spp</i> 606
	3	PR22 : AMX AMC F	<i>Enterobacter aerogenes</i> 1402
		PR 23 : PEN AN K	<i>S aureus</i> 324
	4	PR 24 : AM AMC CZ CS	<i>Serratia marsescens</i> 263
		PR 25 : AM AMC CZ CIP	<i>Kp</i> 676
		PR 26 : AM AMC CZ SXT	<i>Kp</i> 653
		PR 27 : E DA QDF SXT	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 265
		PR 28 : AMX AMC NA CIP	<i>Citrobacter koseri</i> 759
	5	PR 29 : AM AMC CZ CTX SXT	<i>Kp</i> 280 <i>KP 343 PV a</i>

			<i>KP 343 PV g</i> <i>Kp 403</i>
		PR 30 : AM AMC CZ CTX CS	<i>Morganella morganii</i> 334
		PR 31 : AM AMC CZ CTX GM	<i>E coli 676</i> <i>E coli 653</i>
	7	PR 32 :TIC TCC PIP CAZ IMP CIP LVX	<i>Pseudomonas spp 248</i>
	8	PR 33 : TIC TCC PIP IPM GM AN TOB NET	<i>Pseudomonas spp 116</i>
3 familles	3	PR 34 : PEN K FA	<i>SCN 179</i>
		PR 35 : PEN TET FA	<i>S aureus 352</i>
		PR 36 : AM CIP SXT	<i>K oxytoca 703</i>
	4	PR 37 : AM AMC CIP SXT	<i>E coli 514</i> <i>E coli 441</i>
		PR 38 : ERT IPM GM NA	<i>Enterobacter cloacae</i> 151
		PR 39 : AM CIP LVX TET	<i>Aerococcus urinae 441</i>
		PR40 : AMX AMC SXT F	<i>E coli 836</i>
		PR 41 : AMX NA CIP SXT	<i>E coli 627</i>
		PR 42 : AM CTX AZM RA	<i>Neisseria spp 70</i>
5	PR 43 : AM AMC CZ Cs SXT	<i>Serratia marsescens</i> 561	
	PR 44 : AM CZ CTX GM SXT	<i>Kp147</i>	
	PR 45 : AM AMC NA CIP SXT	<i>E coli 257</i>	
	PR 46 : AM AMC CZ GM Cs	<i>Providencia stuartii 675</i>	
	PR 47 : AM CZ CTX NA SXT	<i>Kp161</i>	
	PR 48 : STR ^H E CM QDF TET	<i>Enterococcus faecalis</i> 548	
6	PR 49 : AM AMC CZ CTX GM SXT	<i>Kp 641</i> <i>Enterobacter cloacae</i> 500	

		PR 50 : AM AMC CZ CTX CIP SXT	<i>Kp 402</i> <i>E coli 489</i> <i>Kp 539</i> <i>E coli 539</i>
		PR 51 : AM AMC CZ CTX GM CIP	<i>Kp 359</i>
		PR 52 : AM AMC CZ IPM CIP Cs	<i>Morganella morgani</i> 263
		PR 53 : PEN OX1 OX5 FOX TET FA	<i>S epidermidis 248</i>
		PR 54 : PEN OX1 OX5 FOX E CIP	<i>S aureus 675</i>
		PR 55 : AM AMC CZ CRO GM NA	<i>Citrobacter freundii 251</i>
		PR 56 : AM AMC CZ CTX NA SXT	<i>K oxytoca 671</i>
	7	PR 57 :AM AMC CZ CTX NA CIP SXT	<i>Kp 257</i>
4 familles	4	PR 58 : IPM CIP Cs SXT	<i>P mirabilis 280</i>
	5	PR 59 : CM CIP QDF TET RA	<i>Enterococcus faecalis</i> 263
	6	PR 60 : CTX STRH E CM QDF TET	<i>Enterococcus faecalis</i> 245
		PR 61 : AM GMH E CM QDF LVX	<i>Enterococcus faecium</i> 46
	7	PR 62 : AM AMC CZ CTX AN CIP SXT	<i>E coli 303</i>
		PR 63 : AM AMC CZ CTX GM CIP SXT	<i>E coli 583</i> <i>Enterobacter cloacae</i> 501 <i>KP 490</i>
		PR 64 : AM AMC CZ IPM CIP CS SXT	<i>P vulgaris 268</i>
	8	PR 65 :AM AMC CZ CTX GM NA CIP SXT	<i>E coli 576</i> <i>KP 121</i> <i>KP 126</i>
	11	PR 66 : PEN OX1 OX5 FOX GM K AN OFX CIP LVX TET	<i>S aureus 641</i>

5 familles	8	PR 67 : STRH E CM QDF CIP LVX TET CS	<i>Enterococcus spp</i> 539
		PR 68 : CTX CM E QDF CIP LVX TET RA	<i>Enterococcus faecalis</i> 649
	9	PR 69 : PEN OX1 OX5 K AN E CM TE FA	<i>S aureus</i> 629
		PR 70 : TCC TIC PIP CAZ IPM GM CIP TIG SXT	<i>A baumannii</i> 282
	11	PR 71 : PEN OX1 OX5 FOX GM K OFX CIP LVX SXT RA	<i>S haemolyticus</i> 248
		PR 72 : TIC TCC PIP CAZ IPM GM AN CIP LVX TET SXT	<i>Acinetobacter baumannii</i>
12	PR 73 : PEN OX1 OX5 FOX GM AN K E OFX CIP LVX FA	<i>S aureus</i> 624	
6 familles	10	PR 74 : AM IPM GMH E CM QDF CIP LVX TET RA	<i>Enterococcus faecium</i> 430
	11	PR 75 : PEN OX1 OX5 FOX GM E OFX CIP LVX SXT RIF	<i>S haemolyticus</i> 52

Annexe 8

Tableau X : Résultats de la mise en évidence de la production du pouvoir hémolytique

N° de souche	Nomination souche	Do à 405 nm	Pourcentage de lyse
1	Mmf1	1,977	66,45
2	Ecp2	1,944	45,96
3	Kpa4	1,944	45,96
4	Kpa5	1,940	43,47
5	EcLa1	1,955	52,79
6	<i>E coli</i> 676	1,971	62,73
7	Pvp2	1,985	71,42
8	Enc 676	1,979	67,70
9	Kpp4	1,967	60,24
10	Ec 674	1,954	52,17
11	Kop1	2,001	81,36
12	Smp1	1,998	79,50
13	Smf1	1,994	77,01
14	<i>E coli</i> 6983	1,970	62,11
15	Kpp5	1,974	64,59
16	Ec 653	2,018	91,92
17	Ec 576	1,944	45,96
18	Cf	1,949	49,06
19	Eca2	1,989	73,91
20	Ecp4	1,962	57,14
21	Ecp7	2,122	156,52
22	Pmp1	2,040	105,59
23	Kpa2	2,016	90,68
24	Kpa3	2,013	88,81
25	Kpp1	2,022	94,40
26	Ec 257	1,961	56,52
27	Kps4	1,972	63,35
28	Ckp1	1,962	57,14
29	Psp1	1,959	55,27
30	Kpp3	2,012	88,19
31	Kps1	1,986	72,04
32	Kps2	2,006	84,47
33	Kps3	2,012	88,19
34	Kpa1	1,976	65,83
35	Ecs1	1,975	65,21
36	Kpp2	2,016	90,68
37	Ecp1	1,970	62,11
38	Ecp3	1,954	52,17
39	EcLv1	1,966	59,62
40	EcLas1	1,986	72,04
	Témoin positif	2,031	
	Témoin négatif	1,870	

Remarque : les souches sont désignées par leurs initiales