

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**

**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA 1**



**FACULTE DE MEDECINE**

**DEPARTEMENT DE PHARMACIE**

**CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MECANISMES  
ENZYMATIQUES DE RESISTANCE AUX BETALACTAMINES CHEZ  
LES ENTEROBACTERIES MULTIRESISTANTES  
(ETUDE PROSPECTIVE EN CHU BLIDA)**

**Mémoire de fin d'études**

**Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en  
Pharmacie**

**Session : juin 2018**

**Présentée par :**

- **ARIBI Amina**
- **ATCHI Safaa**

**Devant le jury :**

- **Présidente : Dr Dahmani. F**      **M. Assistante en Microbiologie USDB**
- **Examinatrice : Dr Berouaken. S**      **M. Assistante en Microbiologie USDB**
- **Examinatrice : Dr Naït Kaci. A**      **Assistante en Microbiologie EHS**  
**psychiatrie Blida**
- **Promtrice : Dr Benamara.M**      **M. Assistante en Microbiologie USDB**

## *Remerciements :*

*- Tout d'abord on Remercie DIEU tout puissant de nous avoir donné la force, l'audace pour dépasser toutes les difficultés et la patience d'accomplir ce modeste travail*

*- En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Dr BENAMARA Mounia , Merci chère Docteur pour votre disponibilité , votre tolérance, votre orientation et vos conseils précieux. Vous êtes un modèle et une source de motivation pour nous par votre modestie et votre maîtrise et compétence en Enseignement , vous avez valorisé notre thèse par un thème minutieusement choisi, avec un objectif à la fois scientifique et humain (trouver des approches thérapeutiques pour résoudre une situation délicate liée directement aux patients) , ce qui nous a permis non seulement d'acquérir beaucoup de connaissances mais aussi de nous rappeler que la conscience professionnelle et l'intérêt du patient sont la première priorité de notre travail , Veuillez croire Docteur à l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre grand respect.*

*- A Notre Maitre et Présidente de Jury : Dr. DAHMANI.F et notre examinatrice Dr BEROUAKEN .S on vous remercie infiniment d'avoir accepté d'évaluer notre travail et aussi pour votre disponibilité et votre soutien pour le long de cette expérience , On vous exprime par ces quelques mots notre profond respect et notre reconnaissance.*

*- on remercie profondément Dr NAIT KACI.A, C'est un très grand honneur de vous avoir comme examinatrice dans notre jury.*

*- Enfin, nous tenons également à remercier tout le personnel de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida unité FRANTZ FANON spécialement Mme BENKHITER.A qui nous a guidé à trouver la meilleure encadreuse merci Aïcha, et merci pour toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

*Je dédie cette Thèse*

*... AMINA*

*A MA TRÈS CHÈRE MÈRE: TLIDENE Fatma*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.*

*Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*A MON PÈRE,*

*A MON CHÉR FRÈRE: ABDOU,*

*Mon Cher frère qui m'est le père et la mère, Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A MES SOEURS ADORÉES: ASMAA ET KHAOULA,*

*Vous étiez toujours à mes côtés, merci pour votre présence, votre amour et votre encouragement, que ce travail vous témoigne de ma sincère affection*

*A MA PETITE NIECE MARIA,*

*Que dieux te garde pour nous, merci d'être dans ma vie pour faire mon bonheur*

*A TOUTE LA FAMILLE ARIBI ET LA FAMILLE TLIDJENE*

*A ma chère binôme SAFAA et à tous mes AMIS et mes COLÈGUES*

*A ma chère AICHA, merci pour ton aide*

*A tous ceux qui m'ont enseigné tout au long de mes études  
Et aux personnes qui m'ont toujours encouragé*

*Dédicaces :*

*Safaa*

*Je ne peux clôturer mon mémoire qu'avec mes chers, mes piliers où encore la raison de ce que j'ai pu devenir aujourd'hui, mes parents, vraiment c'est là où les mots ne suffiront jamais, un sentiment au-delà de toutes expressions. À eux qui ont été à mes côtés aux moments les plus difficiles, m'ont soutenu, m'ont encouragé à accomplir mon chemin avec leurs sacrifices, leurs présence et leurs conseils, Avec leurs amours leur inquiétudes et leur prières que j'arrivais à prendre mon souffle à chaque fois, oui à vous mes deux chers que je dédie non seulement mon travail mais plutôt toute ma vie.*

*Je tiens aussi à remercier ma soeur chérie IHSÈNE et son mari SIDALI, un beau frère ou encore un frère au vrai sens du mot, merci pour votre hospitalité, vraiment vous m'étiez mon 2eme foyer, merci encore pour vos services à tous moments. vous étiez toujours là pour moi avec vos grands coeurs.*

*Je le dédie également à mon petit prince MOUAD qui nous a éclairé l'existence, il suffirait que je le voit et toute mon humeur entre dans l'ordre, la joie et l'amour me submergeait, sans oublier le futur ange MOHAMED YASSER qu'on l'attend avec impatience et qui est déjà notre 2eme source de bonheur, bienvenue au monde mon petit.*

*À mes soeurs d'amour, compagnantes et amies MEROUA et ABIR. Avec vos beaux services vous me donnez beaucoup plus que vous croyez, je suis vraiment chanceuse de vous avoir dans ma vie, merci mes jolies perles.*

*Encore à mes deux chéries que je considère comme étant vrais soeurs également DALILA et SAMIA, merci d'être à mes côtés  
À mon camarade et cher ami AMINE merci pour ton aide précieuse, j suis reconnaissante pour tes services.*

*À ma binôme AMINA et mes amis : HADJER, IMANE et EL HADI, tous ce qui ont contribué de près ou de loin pour ce que ce projet soit possible, je vous dis merci*

## RESUME

Les entérobactéries multi et ultrarésistantes constituent un réel problème de santé publique. L'objectif principal de ce travail est la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance de ces bactéries.

Il s'agit d'une étude prospective s'étalant sur une période de 4 mois allant de Janvier à Avril 2018. L'étude a porté sur les isolats d'entérobactéries isolées au niveau du laboratoire central du CHU Blida, unité Frantz Fanon, chez les patients hospitalisés atteints d'hémopathies malignes, différents tests phénotypiques ont été effectués ce sont les tests de caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques de la résistance aux C3G et aux carbapénèmes.

Nous avons reçue 136 prélèvements, et au total 76 souches bactériennes ont été isolées, 40 d'entre elles sont des entérobactéries, 26 souches d'entérobactéries présentent une diminution de diamètres autour de C3G : 20 souches étaient productrices des bêtalactamases à spectre élargie, dont 07 souches présentaient une coproduction de céphalosporinase à haut niveau. Et 03 souches étaient résistantes aux carbapénèmes (les 03 sont productrices de carbapénémases).

En conclusion,

La définition précise du mécanisme d'antibiorésistance permet la mise en route du protocole thérapeutique le plus adapté et la démarche préventive la plus appropriée ; la rationalisation de la prescription des antibiotiques sont les mesures fortement recommandées permettant de limiter l'extension de la diffusion et l'émergence de ces souches multirésistantes.

**Mots clés :**

Antibiotiques, caractérisation phénotypique, entérobactéries, multirésistance, ultrarésistance.

## ملخص

تعد البكتيريا المعوية المتعددة و الفائقة المقاومة مشكلة صحية عامة حقيقية. حيث كان الهدف الرئيسي من هذا العمل هو وصف المظاهر لآليات المقاومة .

يتمحور ذلك في دراسة استطلاعية على مدى أربعة أشهر من يناير الى ابريل 2018. ركزت الدراسة على البكتيريا المعوية المعزولة على مستوى المختبر المركزي الوحدة الاستشفائية الجامعية البليلة فرانتز فانون، عند المرضى في المصلحة المختصة بالأورام الخبيثة الدموية، حيث أجريت الاختبارات المظهرية المتمثلة في اختبارات التوصيف المظهري للآليات الأنزيمية لمقاومة سيفالوسبورين الجيل الثالث والكاربابينيمات.

جمعنا 136 عينة، كان منها 76 سلالة معزولة التي تم تحديدها، 40 منها بكتيريا معوية، 26 سلالة معوية قد خفضت القطر حول سيفالوسبورين الجيل الثالث، بينهم 3 سلالات مقاومة للكاربابينيمات: 20 سلالة كانت مفرزة للبيتا لكتاماز لمجال واسع 07' منها افرزت منتجات مشتركة من سيفالوسبورين ذو مستوى عالي. فيما يتعلق بأبحاث بكتيريا معوية منتجة الكاربابينيماز ، كانت 3 سلالات إيجابية لاختبار الهدج ، انها بكتيريا معوية منتجة الكاربابينيماز

الكشف المبكر على الأشخاص المصابين والتشخيص السريع لهذه البكتيريا المتعددة والفائقة المقاومة وتبرير وصف المضادات الحيوية ينصح بشدة للحد من انتشار و ظهور هته السلالات عالية المقاومة وهكذا فإن التعريف الدقيق للآليات المقاومة للمضادات الحيوية يسمح لها ببداية بروتوكول العلاج والنهج الوقائي الأنسب

الكلمات المفتاحية: بكتيريا معوية ، مقاومة متعددة ، مقاومة فائقة ، مقاومة تامة ، توصيف مظهري

## **Abstract**

Multi-resistant and ultra-resistant enterobacteria are a real public health problem. The main objective of this work was the phenotypic characterization of these resistance mechanisms.

This is a prospective study spanning a period of 4 months from January to April 2018. The study focused on enterobacterial isolates isolated at the central laboratory of CHU Blida, Frantz Fanon unit, on hospitalized patients with hematological malignancies, various phenotypic tests were carried out, which are the tests of phenotypic characterizations of the enzymatic mechanisms of resistance to C3G and carbapenems.

We've collected 136 samples, and a total of 76 strains were isolated and identified, of which 40 are Enterobacteriaceae, 26 strains of enterobacteria show a decrease in diameters around C3G of which 3 strains were resistant to carbapenems: 20 strains was ESBL +, 07 strains among them present a coproduction of CHN. Regarding the research of EPC, 3 strains were positive to the Hodge test, so they are EPC.

In conclusion, the early identification of the infected and colonized subjects, the fast diagnosis of these multi and ultra-resistant enterobacteria, and the rationalization of the prescription of antibiotics are the highly recommended measures to limit the extent of spread and the emergence of these strains. multiresistant.

Thus, the precise definition of the antimicrobial resistance mechanism allows for the setting up of the most appropriate therapeutic protocol and the most appropriate preventive approach.

Key words: Enterobacteriaceae, multiresistance, ultraresistance, totoresistance, phenotypic characterization

**TABLE DES MATIERES**

REMERCIEMENTS.....	II
RESUME.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES AREVIATIONS.....	XXI
INTRODUCTION	

***PARTIE BIBIOGRAPHIQUE***

<b>CHAPITRE I : ENTEROBACTERIES : Rappel bactériologique.....</b>	<b>1</b>
I.1.Définition.....	1
I.2.Classification.....	1
I.3.Caractères bactériologiques.....	2
I.3.1.Caractères morphologiques.....	2
I.3.2.Caractères cultureux.....	2
I.3.3.Caractères biochimiques.....	3
I.3.4. Caractères antigéniques.....	4
I.4.Habitat.....	5
I.5.Pouvoir pathogène.....	5
 <b>CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES : Rappel.....</b>	 <b>6</b>
II.1. Définition.....	6
II.2. Mode d'action.....	6
II.3. Classification.....	7
II.3.1. Critères de classification.....	7
II.3.2. Les principales classes d'antibiotiques.....	7
II.3.2.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	7
II.3.2.2. Inhibiteurs de la synthèse des protéines.....	7



II.3.2.3. Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.....	8
II.3.2.4. Inhibiteurs des acides nucléiques.....	8
II.3.2.5. Inhibiteurs de la synthèse des folates.....	9
II.3.2.6. Inhibiteurs de bêtalactamases non-bêtalactamines.....	9
II.4. Bêtalactamines.....	9
II.4.1. Définition.....	9
II.4.2. Structure.....	10
II.4.3. Mode d'action.....	10
II.4.4. Classification.....	11
II.4.4.1. Pénicillines.....	11
II.4.4.2. Céphalosporines.....	11
II.4.4.3. Carbapénèmes.....	12
II.4.4.4. Monobactames.....	12
II.4.4.5. Inhibiteurs de bêtalactamases.....	12
 <b>CHAPITRE III : LA RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX</b>	
<b>ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>13</b>
III.1. Résistance naturelle chez les entérobactéries.....	13
III.1.1. Phénotype de résistance naturelle des entérobactéries aux bêtalactamines	14
III.2. La multi et l'ultrarésistance chez les entérobactéries .....	17
III.2.1. Définitions.....	17
III.2.1.1. Entérobactéries multirésistantes.....	17
III.2.1.2. Entérobactéries ultrarésistantes.....	17
III.2.2. Principaux mécanismes de la multi et l'ultrarésistance chez les	
entérobactéries.....	18
III.2.2.1. Rappel sur les bêtalactamases.....	18
III.2.2.1.1. Définition des bêtalactamases.....	18
III.2.2.1.2. Classification des bêtalactamases.....	19

III.2.2.2. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu .....	21
III.2.2.3. Les entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinases.....	22
III.2.2.4. Les entérobactéries productrices de carbapénèmes.....	23
III.3. La toto-résistance chez les entérobactéries.....	27
III.3.1. Définition.....	27
III.3.2. Mécanismes de la totorésistance chez les entérobactéries.....	27
 <b>CHAPITRE IV : METHODES DE CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MECANISMES D'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROBACTERIES.....</b>	
<b>CHAPITRE IV : METHODES DE CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MECANISMES D'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROBACTERIES.....</b>	<b>29</b>
IV.1. Caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques.....	29
IV.1.1. Définition.....	29
IV.1.2. Intérêt.....	29
IV.1.3. Limites.....	29
IV.2. Etude de la sensibilité in vitro des entérobactéries aux antibiotiques.....	29
IV.2.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par méthode de diffusion en gélose.....	29
IV.2.2. Détermination des CMI par méthode de dilution en milieu liquide.....	30
IV.2.3. Détermination des CMI par méthode de dilution en gélose.....	31
IV.2.4. Technique de l'E-Test.....	31
IV.2.5. Cas particulier : Les tests de susceptibilité à la colistine (polymyxine E)....	32
IV.2.5.1. Microdilution en bouillon (BMD).....	32
IV.3. Tests phénotypiques pour la recherche des principaux mécanismes enzymatiques de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.....	33
IV.3.1. Méthodes phénotypiques appliquées à la recherche de BLSE.....	33
IV.3.1.1. Test de synergie.....	34
IV.3.1.2. Test de confirmation ou technique du double disque.....	34
IV.3.1.3. Test à la Cloxacilline.....	35
IV.3.1.4. E-test BLSE.....	36
IV.3.1.5. Milieu chromogène de détection de BLSE (chromID ESBL).....	37
IV.3.1.6. Méthodes automatisées.....	38
IV.3.2. Méthodes phénotypiques appliquées à la recherche de céphalosporinases hyperproduites.....	38
IV.3.2.1. Méthode des 2 disques de céfoxitine et céfotétan avec inhibiteur.....	38

IV.3.2.2. Test à la cloxacilline.....	39
IV.2.2.3. Test d'inhibition par l'acide boronique.....	39
IV.3.2.4. Recherche à partir de l'extrait enzymatique.....	40
IV.3.3. Méthodes phénotypiques appliquées à la recherche des entérobactéries productrices de carbapénèmases.....	41
IV.3.3.1. Indication de la détection des EPC.....	41
IV.3.3.2. Test de Hodge modifié.....	43
IV.3.3.3. CIM (Carbapenem Inactivation Method).....	44
IV.3.3.4. Tests d'inhibition.....	44
IV.3.3.4.1. Méthodes des disques combinés.....	45
IV.3.3.4.2. E-Test (inhibition par EDTA).....	46
IV.3.3.4.3. Inhibition de la témocilline.....	46
IV.3.3.5. Tests biochimiques.....	46
IV.3.3.5.1. Carba NP test.....	46
IV.3.3.5.2. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	47
IV.3.3.6. Spectrométrie UV.....	49
IV.3.3.7. Milieux de dépistage spécifiques.....	49

## **CHAPITRE V : Situation épidémiologique de l'antibiorésistance des**

<b>entérobactéries.....</b>	<b>51</b>
V.1. Situation épidémiologique des entérobactéries résistantes aux C3G.....	51
V.1.1. Dans le monde .....	51
V.1.2. En Amérique.....	51
V.1.3. En Europe.....	51
V.1.4. Au Maghreb.....	51
V.1.5. En Algérie.....	52
V.2. Situation épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénèmases .....	52
V.2.1 : Dans le monde.....	52
V.2.1.1. Les EPC de classe A.....	52

V.2.1.2. Les EPC de classe B.....	52
V.2.1.3. Les EPC de classe C.....	53
V.2.2. En Amérique.....	53
V.2.3. En Europe.....	53
V.2.4. Au Maghreb.....	54
V.2.5. En Algérie.....	54
V.3. Situation épidémiologique des entérobactéries résistantes à la colistine.....	54
V.3.1. Dans le monde .....	54
V.3.2. En Europe .....	55
V.3.3. En Amérique .....	56
V.3.4. Au Maghreb.....	56
V.3.5. En Algérie.....	56
<b>VI. Traitement et Prévention :.....</b>	<b>57</b>
VI.1. Traitement .....	57
VI.1.1. Approches thérapeutiques des infections causées par des entérobactéries résistantes aux C3G.....	57
VI.1.1.1. Céphamycines (Mefoxin ®) .....	57
VI.1.1.2. Céfépime (AXEPIM®) .....	57
VI.1.1.3. Piperacilline + tazobactam (TAZOCILLINE®).....	58
VI.1.1.4. Ceftolozane + tazobactam (ZERBAXA®) .....	58
VI.1.1.5. Ceftazidime + avibactam ( ZAVICEFTA® ) .....	58
VI.1.1.6. Pivmécillinam (Selexid®) .....	58
VI.1.1.7. Témocilline (Négaban®) .....	59
VI.1.2 Approches thérapeutiques des infections causées par les entérobactéries productrices de carbapénèmases.....	59
VI.1.2.1. Les carbapénèmes.....	59
VI.1.2.2. La polymyxines E ( Colistine ®) .....	60
VI.1.2.3. Les aminoglycosides.....	60
VI.1.2.4. Les infections causées par les EPC classe A.....	61
VI.1.2.4.1. Amoxicilline+ acide clavulanique(AUGMENTIN®).....	61

VI.1.2.5. Les infections causées par les EPC classe B.....	61
VI.1.2.5.1. L'Aztréonam en monothérapie et en association avec Avibactam.....	61
VI.1.2.5.2. Ceftriaxone+ Sulbactam+EDTA.....	62
VI.1.2.6. Les infections causées par les EPC classe D OXA-48.....	62
VI.1.2.6.1. Ceftazidime.....	62
VI.1.3. Approches thérapeutiques des infections causées par des entérobactéries résistantes aux polymyxines.....	62
VI.2. Prévention.....	65
VI.2.1. Prévention de la transmission croisée.....	65
VI.2.1.1. Les précautions Standard PS.....	65
VI.2.1.2. Les précautions complémentaires (de type contact).....	66
VI.2.1.3. Les mesures maximales (search an isolate).....	67
VI.2.2. La bonne gestion des antibiotiques.....	67
VI.2.3. La mise en place de mesures spécifiques.....	68

### ***PARTIE PRATIQUE***

<b>CHAPITRE VII. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>69</b>
VII.1. Présentation de l'étude.....	69
VII.1.1. Type et période d'étude .....	69
VII.1.2. Objectifs .....	69
VII.1.4. Critères d'inclusion .....	69
VII.1.5. Critères d'exclusion .....	70
VII.2. Matériel .....	70
VII.2.1. Appareillage .....	70
VII.2.2. Matériel non biologique .....	70
VII.2.3. Matériel biologique .....	70
VII.3. Méthodes .....	70
VII.3.1. Recueil des données .....	70
VII.3.2. Isolement et identification des entérobactéries .....	70
VII.3.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	71

VII.3.4. Caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries sélectionnées.....	71
VII.3.4.1. Caractérisation phénotypiques des mécanismes enzymatiques de la résistance aux C3G .....	71
VII.3.4.1.1. Test de synergie .....	71
VII.3.4.1.2. Test à la Cloxacilline .....	72
VII.3.4.1.3 Test du double disque (test Espagnol).....	74
VII.3.4.2. Caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes (recherche et typage des carbapénèmases) .....	75
VII.3.4.2.1 Recherche des carbapénèmases par le test de Hodge Modifié.....	75
VII.3.4.2.2. Typage des carbapénèmases .....	76
VII.3.4.2.2.1. Test d'inhibition par l'EDTA.....	76
VII.3.4.2.2.2. Test à la témocilline .....	77
<b>CHAPITRE VIII : RESULTATS .....</b>	<b>80</b>
VIII.1. Prélèvements.....	80
VIII.1.1.Nature des prélèvements.....	80
VIII.1.2. Répartition des prélèvements reçus selon leur type .....	80
VIII.2.Taux de positivité des cultures bactériennes .....	81
VIII.3. Place des entérobactéries parmi les bactéries isolées.....	82
VIII.4. Répartition des entérobactéries isolées selon les prélèvements dont elles proviennent .....	82
VIII.5. Répartition des entérobactéries selon les espèces auxquelles elles appartiennent.....	83
VIII.6. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques .....	84
VIII.7. Place des entérobactéries multirésistantes parmi les BMR .....	87
VIII.8. Résultats de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries .....	88

VIII.8.1. Résultats des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux C3G .....	88
VIII.8.1.1. Résultats du test de synergie.....	88
VIII.8.1.2. Résultats du test à la cloxacilline .....	90
VIII.8.1.3. Résultats du test du double disque (test Espagnol) .....	91
VIII.8.2. Résultats des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes (résultat de la recherche et du typage des carbapénèmases)...	95
VIII.8.2.1. Résultats de la recherche des carbapénèmases par le test de Hodge .....	95
VIII.8.2.2. Résultats du typage phénotypique des carbapénèmases .....	96
VIII.8.2.2.1. Résultats du test d'inhibition par l'EDTA .....	96
VIII.8.2.2.2. Résultats du test à la témocilline .....	97
VIII.8.3. Interprétation des résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries .....	98
<b>CHAPITRE IX : DISCUSSION.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSION</b>	
<b>REFERENCES</b>	
<b>GLOSSAIRE</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

### PATRIE THEORIQUE

<b>Tableau 1</b>	Les principaux genres et espèces d'entérobactéries impliquées dans les pathologies humaines.....	1
<b>Tableau 2</b>	Composition et caractères différentiels des tribus des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
<b>Tableau 3</b>	Profil de la résistance naturelle aux antibiotiques chez les entérobactéries.....	13
<b>Tableau 4</b>	Groupes d'entérobactéries selon la résistance naturelle aux bêtalactamines.....	16
<b>Tableau 5</b>	Classification des $\beta$ -lactamases d'après Ambler et Bush.....	20
<b>Tableau 6</b>	Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines et profile d'inhibition chez les entérobactéries productrices de carbapénèmases.....	27
<b>Tableau 7</b>	Break point pour la colistine recommandée par les lignes directrices du CLSI et de l'EUCAST en 2017 chez les entérobactéries.....	33
<b>Tableau 8</b>	Seuils des diamètres d'inhibition préconisés par les standards français, européen et américain pour l'interprétation de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux carbapénèmes.....	42
<b>Tableau 9</b>	Seuils de CMI(Concentration minimale Inhibitrice) préconisés par les standards français, européen et américain pour l'interprétation de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux carbapénèmes.....	42
<b>Tableau 10</b>	les inhibiteurs et leur carbapénèmases inhibées.....	45

### PARTIE PRATIQUE

<b>Tableau 11</b>	Préparation des boites de cloxacilline (ou oxacilline).....	73
-------------------	---	----



<b>Tableau 12</b>	Répartition des entérobactéries par espèce et par type de prélèvement.....	84
<b>Tableau 13</b>	Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries sélectionnées.....	85
<b>Tableau 14</b>	Les résultats du test de synergie pour chaque souche testée.....	89
<b>Tableau 15</b>	les résultats du test à la cloxacilline pour chaque souche testée.....	90
<b>Tableau 16</b>	Résultats du test de double disque pour chaque souche testée.....	91
<b>Tableau 17</b>	Résultats global des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux Céphalosporine 3eme Génération.....	92
<b>Tableau 18</b>	Résultats du test de Hodge pour chaque souche testée.....	95
<b>Tableau 19</b>	Résultats du test d'inhibition par l'EDTA pour chaque souche testée..	96
<b>Tableau 20</b>	Résultats du test à la témocilline pour chaque souche testée.....	97
<b>Tableau 21</b>	Résultat global des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes.....	98
<b>Tableau 22</b>	Interprétation des résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries .....	99

## LISTES DE FIGURES

<b>Figure 1</b>	Les bacilles à Gram négatif observés au microscope optique (Gx100).....	2
<b>Figure 2</b>	Culture de <i>Yersinia</i> sur gélose au sang .....	3
<b>Figure 3</b>	Culture sur gélose nutritive .....	3
<b>Figure 4</b>	Galerie Api 20 E pour l'identification des entérobactéries.....	3
<b>Figure 5</b>	Localisation des antigènes H, O et K dans une entérobactérie.....	5
<b>Figure 6</b>	mode d'action des antibiotiques.....	6
<b>Figure 7</b>	Structure des différentes classes de $\beta$ -lactamines .....	10
<b>Figure 8</b>	Site d'action des bêtalactamines.....	11
<b>Figure 9</b>	Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame.....	18
<b>Figure 10</b>	Schéma explicatif des mécanismes de production d'AmpC.....	23
<b>Figure 11</b>	Spectre d'activité des carbapénèmes chez les Enterobacteriaceae...	24
<b>Figure 12</b>	CMI par méthode de dilution en milieu liquide (macrodilution).....	30
<b>Figure 13</b>	plaques de microdilution pour la détermination des CMI.....	31
<b>Figure 14</b>	Souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de bêtalactamase à spectre élargi (Bouchon de champagne).....	34
<b>Figure 15</b>	Test du double disque positif : <i>K. pneumoniae</i> productrice de BLSE.	35
<b>Figure 16</b>	Antibiogramme d'une souche d' <i>E. cloacae</i> sur une gélose MH avec et sans Cloxacilline.....	36
<b>Figure 17</b>	Détection de BLSE par l'E-test.....	38
<b>Figure 18</b>	Identification des entérobactéries BLSE par chromID ESBL.....	38
<b>Figure 19</b>	Recherche des Cases par la méthode des 2 disques de céfoxitine et céfotétan avec inhibiteur .....	39
<b>Figure 20</b>	Comparaison entre le test de confirmation pour les BLSE et le test à l'acide boronique pour la détection des AmpC.....	40

<b>Figure 21</b>	Recherche de céphalosporinase à partir de l'extrait enzymatique.....	41
<b>Figure 22</b>	Test de Hodge modifié.....	43
<b>Figure 23</b>	test de CIM.....	44
<b>Figure 24</b>	Schéma proposé par Rosco illustre la disposition des disques et les distances entre eux pour la détection des carbapénèmases KPC, métallo- $\beta$ -lactamases et oxacillinases .....	45
<b>Figure 25</b>	Principe du test de diagnostic rapide, Carba NP test.....	47
<b>Figure 26</b>	Les principales étapes de l'identification par MALDI-TOF à partir de colonies.....	48
<b>Figure 27</b>	ChromID® (bioMérieux).....	49
<b>Figure 28</b>	Carba Brilliance® CRE(OXOID).....	49
<b>Figure 29</b>	Schéma globale des différentes méthodes phénotypiques pour la recherche de BLSE, CHN et Carbapénèmases.....	50
<b>Figure 30</b>	Algorithme thérapeutique des entérobactéries résistantes à la colistine.....	63
<b>Figure 31</b>	Schéma résume les possibilités thérapeutiques des infections causées par Enterobacteries Résistantes .....	64
<b>Figure 32</b>	Les étapes de la réalisation du test de synergie.....	72
<b>Figure 33</b>	Les étapes de la réalisation du test à cloxacilline .....	73
<b>Figure 34</b>	Les étapes de la réalisation du test du double disque.....	74
<b>Figure 35</b>	Les étapes de la réalisation de test de Hodge modifié.....	76
<b>Figure 36</b>	Les étapes de la réalisation du test à l'EDTA .....	77
<b>Figure 37</b>	Réalisation du test à la témocilline .....	78
<b>Figure 38</b>	Logigramme résume le suivi du protocole durant notre pratique.....	79
<b>Figure 39</b>	Répartition des prélèvements selon l'étude demandée .....	80
<b>Figure 40</b>	Répartition des prélèvements selon leur type .....	81

<b>Figure 41</b>	Schéma simplifiée de la répartition des prélèvements selon l'étude demandée et le taux de positivité des cultures bactériennes.....	81
<b>Figure 42</b>	Répartition des bactéries isolées selon les espèces.....	82
<b>Figure 43</b>	Place des entérobactéries parmi les bactéries isolées.....	82
<b>Figure 44</b>	Répartition des entérobactéries selon la visée des prélèvements.....	83
<b>Figure 45</b>	Répartition des entérobactéries selon les espèces.....	83
<b>Figure 46</b>	Place des entérobactéries résistantes parmi les entérobactéries isolées	86
<b>Figure 47</b>	Répartition des BMR isolées selon l'espèce bactérienne.....	87
<b>Figure 48</b>	Test de synergie .....	88
<b>Figure 49</b>	Test à la cloxacilline.....	90
<b>Figure 50</b>	Test du double disque.....	91
<b>Figure 51</b>	Logigramme pour une meilleure détection des mécanismes de résistance aux Céphalosporines 3 eme Génération.....	94
<b>Figure 52</b>	Test de Hodge modifié .....	95
<b>Figure 53</b>	Test d'inhibition par l'EDTA.....	96
<b>Figure 54</b>	Test à la témocilline.....	97
<b>Figure 55</b>	Schema resume les resultats globaux de testes de la caracterisation phenotypique de mecanismes enzymatique de resistance aux betalactamine .....	98

## ANNEXES

<b>Annexe I</b>	Mécanismes de la résistance bactérienne aux ATB
<b>Annexe II</b>	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI chez les entérobactéries
<b>Annexe III</b>	Fiches techniques
<b>Annexe IV</b>	Technique de microdilution en bouillon BMD

## Liste des abréviations

- **µg** : Micro gramme
- **µm** : Micromètre
- **ABPA** : Acide aminophénylboronique
- **ADN** : Acide désoxyriboNucleique
- **AMC** :Amoxicilline+Acide Clavulanique
- **AminoP+CLA** : Aminopenicilline + clavulanate
- **AMP** : Ampicilline
- **AmpC** :Adénosine monophosphate cyclique
- **AMX** :Amoxicilline
- **Anses** :Agence National de la sécurité sanitaire
- **ARN**: Acide ribonucléique  
**ARNm**: acide ribonucléique messenger
- **ATB** : Antibiotique
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **BGN** : Bacille à Gram Négatif
- **BHRe**: Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques Emergentes
- **BLSE** : Bétalactamase a spectre elargie
- **BMD** : Broth microdilution (Microdilution en bouillon)
- **BMR**: Bacterie MultiRésistantes
- **BOR** : Acide Boronique.
- **BRL** : N-1 methyl-1, 2,3-triazolyl méthylène
- **C** : Celsius
- **C. cepacia** : *Citrobacter cepacia*
- **C. freundii** :*Citrobacter freundii*
- **C. jejuni** : *Citrobacter jejuni*
- **C.amalonicus** : *Citrobacter amalonicus*
- **C.koseri** : *Citrobacter koseri*
- **C.Sedlakii**: *Citrobacter sedlakii*
- **C1G** : Céphalosporine de 1<sup>ere</sup> Génération
- **C2G** : Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> Génération
- **C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> Génération
- **C4G** : Céphalosporine de 4<sup>ème</sup> Génération
- **CAC** : Centre Anti Cancer
- **CarboxyP+CLA** : Carboxypenicilline+ clavulanate
- **Case** : Céphalosporinase
- **CA-SFM** : Communauté d'antibiogramme de Société française de microbiologie
- **CClin** : Centre de Coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
- **CDC** : Centers for Disease Control and Prevention
- **CHN** : Céphalosporinase haut niveau

- **CHU** : Centre Hospitalier  
Universitaire
- **CIM** : Carbapenem Inactivation  
Method
- **CLOXA**: Cloxacilline
- **CLSI**: Clinical and Laboratory  
Standard Institute
- **CMI** : Concentration minimale  
inhibitrice
- **COL** : Colistine
- **CRO** :Céftriaxone
- **CTT** : Cefotetan
- **CTX** : Céfotaxime
- **CTX-M** :Céfotaximases-Munich
- **D-Ala-D-Ala** : Le dipeptide D-  
alanyl-D-alanine.
- **DD** : Test du Double Disques
- **DHPS** :Dihydroptéroate  
synthétase
- **DPA**: Acide dipicolinique
- ***E .coli*** : *Escherichia coli*  
***E.aerogenes***: *Enterobacter*  
*aerogenes*
- ***E. hermanni*** :*Escherichia*  
*hermanni*
- ***E.cloacae***: *Enterobacter Cloacae*
- ***E.persicina*** : *Enterobacter*  
*persicina*
- **EBLSE** : Entérobactéries  
Sécrétrices de Bétalactamase à  
Spectre Étendu
- **ECA** : *Enterobacteriaceae*  
*common antigen*
- **ECBU** : Etude Cyto  
Bacteriologique des Urines
- **EDTA** : acide éthylène diamine  
tétra-acétique
- **EMR** : Entérobactéries  
MultiRésistantes
- **EPC** : Entérobactéries  
productrices de carbapénèmases
- **ERT**: Ertapénème;
- **EUCAST** : European Committee  
on Antimicrobial Susceptibility  
Testing
- **Ex** : Exemple
- **FAO** : Food agricultur  
organisation (l'Organisation des  
Nations Unies pour l'alimentation  
et l'agriculture)
- **FOX** : Cefoxitine
- **GEI** : Gastro-Entérite-Infantile
- **GEN** : Gentamycine
- **GES** : Guyana extended-  
spectrum
- **Gr**: Groupe
- **H** : Heurs
- ***H. alvei***: *Hafnia alvei*
- **HCSP** : Haut Conseil de Santé  
Publique
- **I** : Intermédiaire
- **IBL** : Inhibiteur de Bétalactamase
- **IM+ED**: Imipénème+EDTA
- **IMI** : Imipenem hydrolysing b-  
lactamase

- **IMP** : Imipénème
- **INH** : Inhibiteur de Case
- **INRS** : Institut National de Recherche et de Sécurité
- **INSPQ** : Institut Nationale de Santé Publique Quebec
- ***K. ascorba*** : *Klebsiella ascorba*
- ***K. pneumonia***: *Klebsiella pneumoniae*
- ***K. cryocrescens***: *Klebsiella cryocrescens*
- ***K. georgina*** : *Klebsiella Georgina*
- ***K. oxytoca***: *Klebsiella oxytoca*
- **KPC** : *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase
- **KT** : Cathéters
- **L-Ara4N**:4-amino-4-désoxy-L-arabinose
- **LCR** : Liquide céphalo-rachidien
- **LPS** : Lipo-Poly-Saccharides
- **M** : muqueuses
- ***M. morgani*** : *Morganella morgani*
- **Mcr** : mobilized colistin resistance ; gene confers plasmid-mediated resistance to colistin
- **MER** : méropénème
- **MF** : Macfarland
- **mg** : milligramme
- **MH** : MUELLER-HINTON
- **MLS** : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines
- **mm** : millimètre
- **MOX** : Moxalactam
- **NDM** : New Delhi métallo-bétalactamase
- **NIT** : Nitrofurane
- **NmCA** : non-métallo carbapénèmase A
- **OIE** : Worth Organisation for animal Helth (Organisation mondiale de la santé animale)
- **OMS** : Organisation mondiale de santé.
- **OXA** : Oxacillinases
- ***P. penneri*** : *Proteus penneri*
- ***P. rettgeri*** : *Proteus rettgeri*
- ***P. vulgaris*** : *Proteus vulgaris*
- ***P. mirabilis*** : *Proteus mirabilis*
- ***P. stuartii*** : *Proteus stuartii*
- **PAVM** : Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique
- **PC** : précautions complémentaires
- **PCR** : polymerase chain reaction
- **PDP** : Prélèvement distale Protégé
- **PDR** : Pan-drug resistant bacteria
- **PER**: Pseudomonas extended resistance
- **pEtN** : phosphoéthanolamine
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **PIP** : Pipéracilline
- **PL** : Ponction Lombaire

- **PLPs** : protéines liant les pénicillines
- **Plv** : prélèvement
- **PNN**: Poly Nucleire Neutrophile
- **PS** : précautions standard
- **Ptm** : phospho-éthanolamine
- **R** :Resistant
- **RAISIN** : Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
- **Ro 48** :  $\beta$  alkenyl penicillamic acid sulfone
- ***S. dysenteriae*** : *Shigella dysenteriae*
- **S** : Sensible
- ***S. fonticola***: *Serratia fonticola*
- ***S. marcescens*** : *Serratia marcescens*
- ***S. sonnei*** : *Shigella sonnei*
- ***S.boydii*** : *Shigella boydii*
- ***S.enterica typhi*** : *Salmonella enterica typhi*
- ***S.flexneri*** : *Shigella flexeneri*
- ***SFO*** :*Serratia fonticola*
- **SHV** : Sulfhydryl variable
- **SME** : *Serratia marcescens* enzyme
- **spp** : Speaces
- **TDA** : *Tryptophane désaminase*
- **TEM** : Temoniera (nom du patient)
- **TIC** :Tiracilline
- **TLA** :TEM Like Activity
- **tr/mn** : tourne par minute
- **UréidoP** :Uréidopenicilline
- **UréidoP+TZA** :Ureidopenicilline +Tazobactam
- **UV** : Ultra Violet
- **VEB** :Vietnamiense extended-spectrum  $\beta$ -lactamase
- **VIM** :Verona Integron Métallo – lactamase
- **VP** : *Réaction de vosges-proskauer*
- **XDR**: extensively-drug resistant bacteri
- ***Y. enterocolitica*** : *Yersinia enterocolitica*
- ***Y. ruckeri*** : *Yersinia ruckeri*
- ***Y.pestis*** :*Yersinia pestis*
- ***Y.pseudotuberculosis***: *Yersinia pseudotuberculo*



## INTRODUCTION :

Les entérobactéries sont des bactéries fréquemment rencontrées en milieu hospitalier (**F. Denis 2011**);, tant au niveau de la flore digestive qu'en tant qu'agent pathogène dans une variété d'infections (**R-M Connie et al 2011**)

Les infections à entérobactéries sont généralement traitées par des bêtalactamines (**F.Robin et al 2012**), à savoir les pénicillines, les céphalosporines à large spectre et les carbapénèmes (imipénème, méropénème, ertapénème) ou encore la colistine.

Au cours des deux dernières décennies, on a observé une augmentation importante de la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques par différents mécanismes (**INRS 2015**) principalement le mécanisme enzymatique via la production d'enzymes hydrolysant les antibiotiques telle que les bêtalactamases à spectre étendu, les céphalosporinases hyperproduites et les carbapénémases (**D. Vodovara 2013**) qui confèrent un haut niveau de résistance allant de la multirésistance jusqu'à la totorésistance

Face à l'émergence de ce phénomène, il est indispensable de réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques afin d'optimiser le choix de l'antibiothérapie ainsi que d'appliquer les tests de caractérisation phénotypiques qui permettent la détection des mécanismes de résistance et maîtriser son mode de dissémination (**PC 2018 – SEHH-CHU Dijon**), et c'est le but de notre thèse la réalisation de certains test phénotypiques afin de la mise en place un meilleur logigramme et prendre les mesures préventives nécessaires

# **LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# **CHAPITRE I : LES ENTEROBACTERIES**

---

## **Rappel bactériologique**

**CHAPITRE 1 : ENTEROBACTERIES: Rappel bactériologique****I.1. Définition:**

La famille des entérobacteriaceae est une très vaste famille qui représente près des trois quarts des isollements d'un laboratoire de bactériologie médicale.

Elle se définit par les caractères communs suivants :

- Bacilles à Gram négatif (2 à 4 microns de long sur 0,4 à 0,6 microns de large).
- Immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche.
- Poussant sur milieux de culture ordinaires (non exigeant).
- Aéro- anaérobies facultatifs.
- Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz (glucose +).
- Réduisant les nitrates en nitrites (nitrate réductase +).
- Oxydase négative. (**R-M Connie et al 2011 ; F. Denis et al 2011**)

**I.2. Classification :**

La famille des enterobacteriaceae comprend de nombreux genres et espèces. La dernière édition du Manuel de Bactériologie Systématique de Bergey décrit 176 espèces nommées parmi 44 genres différents; cependant les espèces les plus rencontrées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres (**R-M Connie et al 2011**)

qui sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 1 :** Les principaux genres et espèces d'entérobactéries impliquées dans les pathologies humaines. (**J-L. FAUCHERE et J-L. AVRIL 2002**)

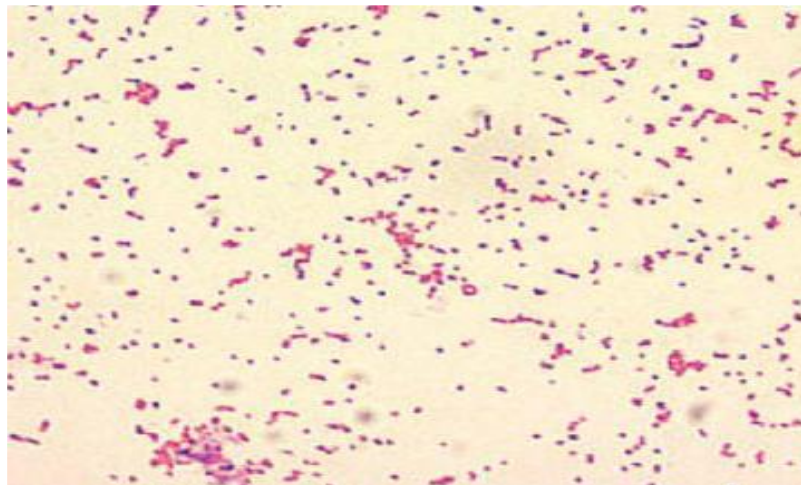
Genre	Espèces
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i>
<b>Shigella</b>	<i>S. dysenteriae, S. sonnei, S. boydii, S. flexneri</i>
<b>Salmonella</b>	<i>S. enterica sérotype Typhi..... &gt; 2000 sérotypes</i>
<b>Klebsiella</b>	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca</i>
<b>Enterobacter</b>	<i>E. cloacae, E. aerogenes....</i>
<b>Serratia</b>	<i>S. marcescens...</i>
<b>Proteus</b>	<i>P. mirabilis, P. vulgaris</i>
<b>Providencia</b>	<i>P. rettgeri, P. stuartii</i>
<b>Morganella</b>	<i>M. morganii</i>
<b>Citrobacter</b>	<i>C. freundii.</i>
<b>Hafnia</b>	<i>H. alvei</i>
<b>Yersinia</b>	<i>Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis</i>

### I.3. Caractères bactériologiques :

#### I.3.1. Caractères morphologiques :

Les entérobactéries répondent aux caractères morphologiques suivants :

- Ce sont des bacilles droits à Gram négatif (figure 1)
- Ils ont une longueur de 1,0 à 6,0  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 0,3 à 1,0  $\mu\text{m}$
- Ils ont une ciliature péritriche pour les formes mobiles
- non sporulés
- on rencontre parfois des formes capsulées (*Klebsiella*). (J. Freney et al 2007)



**Figure 1** : Les bacilles à Gram négatif observés au microscope optique (coloration de Gram) (J-M. Willey 2011)

#### I.3.2. Caractères cultureux :

L'ensemble de ces bactéries pousse très aisément sur milieux ordinaires (18-24H) (figure 3), sauf le genre *Yersinia* qui nécessite au moins 48h de culture (figure 2).

La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives,

En milieu liquide : Les entérobactéries occasionnent un trouble homogène en bouillon.

Sur gélose : Les colonies sont généralement bombées, lisses et brillantes, à contour régulier et leur diamètre est de 1 à 3 mm. (F. Denis et al 2011)

-Colonies **S** (smooth) : arrondies, lisses, humides, blanches ou translucides.

- Colonies **R** (rugueuses) : sèches à contours irréguliers et mates (bactéries vieilles ou anormales).

- Colonies **M** (muqueuses) : grosses colonies  $\pm$  confluentes (*klebsiella spp*).
- Envahissement de la gélose : formation d'un tapis uniforme (*Proteus. spp*). (J-M. Willey 2011)



**Figure 2** : Culture de yersinia sur gélose au sang (F. Denis et al 2011)



**Figure 3** : Culture sur gélose nutritive (F. Denis et al 2011)

### I.3.3. Caractères biochimiques :

Les entérobactéries possèdent les caractères biochimiques communs suivants :

- oxydase négative
- nitrate réductase positive
- fermentation du glucose avec ou sans gaz (glucose +) (J. Freney et al 2007)

Mais ils ont une grande diversité enzymatique qui permet leur identification biochimique par des galeries d'identification de type API 20E® (bioMérieux).



**Figure 4** : Galerie Api 20 E pour l'identification des entérobactéries (originale)

**Tableau 2** : Composition et caractères différentiels des tribus des *Enterobacteriaceae*.  
(F. Denis et al 2011)

Tribus	Escherichiae	Klebsiellae (VP +)(groupe KES)	Proteae (TDA+)	Yersinia
Principaux genres isolés chez l'homme	Escherichia Shigella Salmonella Citrobacter Edwardsiella Kluyvera Moellerella Leclercia Leminorella Yokenella Trabulsiella	Klebsiella Raoultella Enterobacter Cronobacter Hafnia Pantoea Erwinia Serratia Cedecea Rahnella Ewingella	Proteus Providentia Morganella Tatumella	<i>Yersinia</i>
TDA	-	-	+	-
Uréase	-	D	D	+(*)
VP à 37°C	-	D	-(**)	-
VP à 22°C	-	D	D	D
Mobilité	Tous sauf Shigella (quelques souches d' <i>Escherichia coli</i> immobiles)	Tous sauf Klebsiella et Raoultella Pour Pantoea , Rahnella et Erwinia, mobilité à 22 °C	Tous sauf Tatumella	Immobiles à 37 °C, mobiles à 22 °C
Sensibilité à la colistine	Tous sauf Edwardsiella, Moellerella et Yokenella	Tous sauf Serratia et Cedecea	Aucun sauf Tatumella	D

D = différent suivant les genres ou les espèces.

\* Sauf *Y. ruckeri*.

\*\* Sauf Tatumella

#### I.3.4. Caractères antigéniques :

Les entérobactéries possèdent différents antigènes à savoir :

- L'antigène somatique O : antigène de paroi constitué de lipopolysaccharides (LPS) thermostable ;
- L'antigène flagellaire H : constitué de flagelline thermolabile (bactéries mobiles) ;
- L'antigène capsulaire K : constitué de couches externes de polysaccharides qui peuvent masquer l'antigène O ( Klebsiella et certaines souches d' *E. coli* , Shigella, Citrobacter et Salmonella « antigène Vi »);

- L'antigène de Kunitz ou Enterobacteriaceae common antigen (ECA) constitué d'un glycophospholipide spécifique des entérobactéries qui présente un intérêt taxonomique ;
- L'antigène d'adhésions ( pili , fimbriae ). (F. Denis et al 2011)



**Figure 5** : Localisation des antigènes H, O et K dans une entérobactérie (S. Djelouat 2016)

#### I.4. Habitat :

Ce sont pour la plupart des hôtes du tractus digestif de l'homme et des animaux d'où leur nom mais aussi sont largement retrouvés sur les plantes, le sol, et l'eau. (F. Denis et al 2011)

#### I.5. Pouvoir pathogène :

Les entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques :

\*Les infections opportunistes :

- Les actéries présentes au niveau intestinal pouvant, à des degrés variables, devenir agressives pour l'homme. Si elles sont présentes en quantité trop importante ou si on est immunodéprimé, elles deviennent pathogènes.

- Phénomène renforcé par l'acquisition des résistances (dysmicrobisme)

- Se traduisent par des infections diverses : septicémies (50%), des infections urinaires (70%), infections digestives, pneumopathies (*Klebsiella pneumoniae*), méningites néonatales (*E.Coli* K1). (F. Denis et al 2011)

\*Les infections spécifiques :

- Causées par des bactéries non présentes au niveau intestinal. dès qu'elles sont retrouvées dans l'organisme, elles sont responsables d'infections plus ou moins graves. Telle que :

*Salmonella typhi* : responsable de la fièvre typhoïde ;

*Shigella dysenteriae* : responsable de la dysenterie bacillaire ;

*Escherichia coli* (entéropathogène EPEC) : responsable de gastro-entérite infantile ou GEI;

*Yersinia pestis* : responsable de la peste (R-M Connie et al 2011)



## **Chapitre II : LES ANTIBIOTIQUES**

---

**Rappel**

## CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES : Rappel

### II.1. Définition

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle, d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne
- Activité en milieu organique
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme (**O. TALBERT 2011**)

En fonction de leur type d'activité, les antibiotiques peuvent être bactériostatiques ou bactéricides.

### II.2. Mode d'action

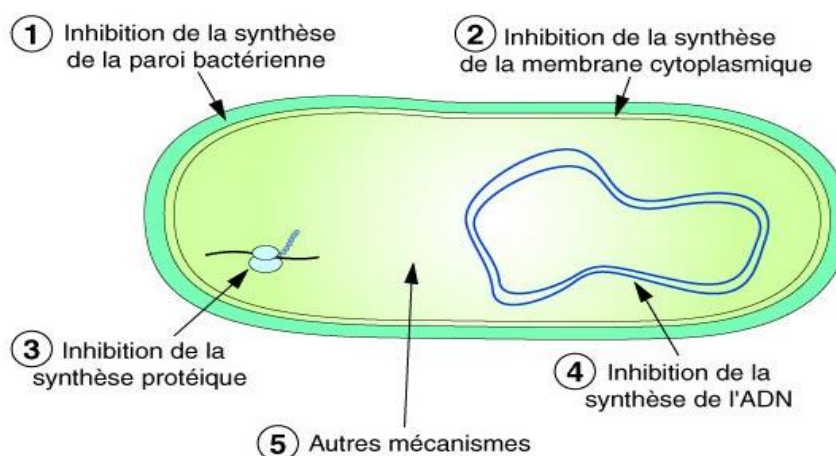
Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. (**J.FRANCOIS et al 2003**)

Ils agissent par :

- **Toxicité sélective au niveau de :**

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Acides nucléiques

- **Inhibition compétitive :** dans ce cas, l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.



**Figure 6:** mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net)

### II.3. Classification :

#### II.3.1. Critères de Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- **Origine :**

Elaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

- **Mode d'action :**

Paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

- **Spectre d'activité :**

Liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

- **Nature chimique :**

Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) (**F. JEHL et al 2003**)

#### II.3.2. Les principales classes d'antibiotiques :

Nous adopterons la classification selon le mode d'action.

##### II.3.2.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane :

- **Les  $\beta$  lactamines :**

Il s'agit d'une famille qui comprend 05 groupes majeurs :

Les Pénames, les Pénèmes, les Oxapénames, les Céphèmes et les Monobactames.

- **Glycopeptides et fosfomycine :**

Les glycopeptides représentés par la Vancomycine et Teicoplanine agissent sur les bactéries Gram (+) (**C. RABAUD et T. MAY 2007**)

##### II.3.2.2. Inhibiteurs de la synthèse des protéines :

- **Aminosides :**

Tel que la Gentamycines, agissent au niveau de la sous unité 30S du ribosome, leur spectre est large et sont souvent utilisés en association avec d'autres antibiotiques.

- **Macrolides-Lincosamides-Streptogramines(MLS) :**

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, ils agissent au niveau de la s/unité 50S du ribosome. (R. LECLERCQ 2006)

- **Tetracyclines :**

Agissent au niveau de la sous unité 30S et sont utilisés contre les bactéries à multiplication intracellulaire. (C. POYART 2006)

- **Phénicolés :**

Chloramphénicol et Thiamphénicol, agissent sur les bactéries à Gram+ et – au niveau de la sous unité 50S du ribosome.

En Algérie ils sont réservés au traitement de la fièvre typho-paratyphoïdique.

- **Oxazolidinones : Linozoline**

Agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome sur les bactéries à Gram+ résistantes aux traitements habituels y compris les multirésistantes.

### II.3.2.3. Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires :

- **Polymixines : polymixine E (colistine) et polymixine B :**

Agissent sur les Bacilles à Gram-, les bactéries à Gram+ et les mycobactéries sont naturellement résistantes.

Ils possèdent une charge positive et agissent comme des agents tensio-actifs. Ils agissent sur la membrane cellulaire en se fixant sur les phospholipides d'où rupture de la barrière osmotique. (V. CATTOIR 2006)

### II.3.2.4. Inhibiteurs des acides nucléiques :

- **Quinolones et Fluoroquinolones :**

Inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien

- **Rifamycines :**

Inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) par inhibition de l'ARN polymérase.

- **Nitrofuranes :**

Agissent directement sur l'ADN provoquant diverses lésions.

### II.3.2.5. Inhibiteurs de la synthèse des folates :

- **Sulfamides : Sulfaméthoxazole**

Inhibent la synthèse des folates, acides puriques et acides nucléiques en se fixant sur la Dihydro-ptéroate synthétase (DHPS)

- **Triméthoprime**

Il est utilisé en association avec les sulfamides, Inhibent la synthèse des folates, acides puriques et acides nucléiques, en se fixant sur la dihydrofolate réductase (F.

**GOLDSTEIN 2006)**

### II.3.2.6. Inhibiteurs de bêtalactamases non-bêtalactamine :

- **Avibactam :**

C'est un nouvel inhibiteur de la  $\beta$ -lactamase non  $\beta$ -lactamine qui inhibe à la fois les enzymes de classe A (KPC) et de classe C (AmpC) et certaines enzymes de classe D, offrant ainsi une protection contre divers mécanismes de résistance à médiation  $\beta$ -lactamase.

Il est actuellement en développement clinique en association avec les céphalosporines (ceftazidime) comme option thérapeutique alternative pour le traitement des infections causées par les Enterobacteriaceae. (**D. Bouteille 2015, S. D. Lahiri 2014)**

On s'intéresse ci-après à la famille des bêtalactamines en raison de leur large utilisation

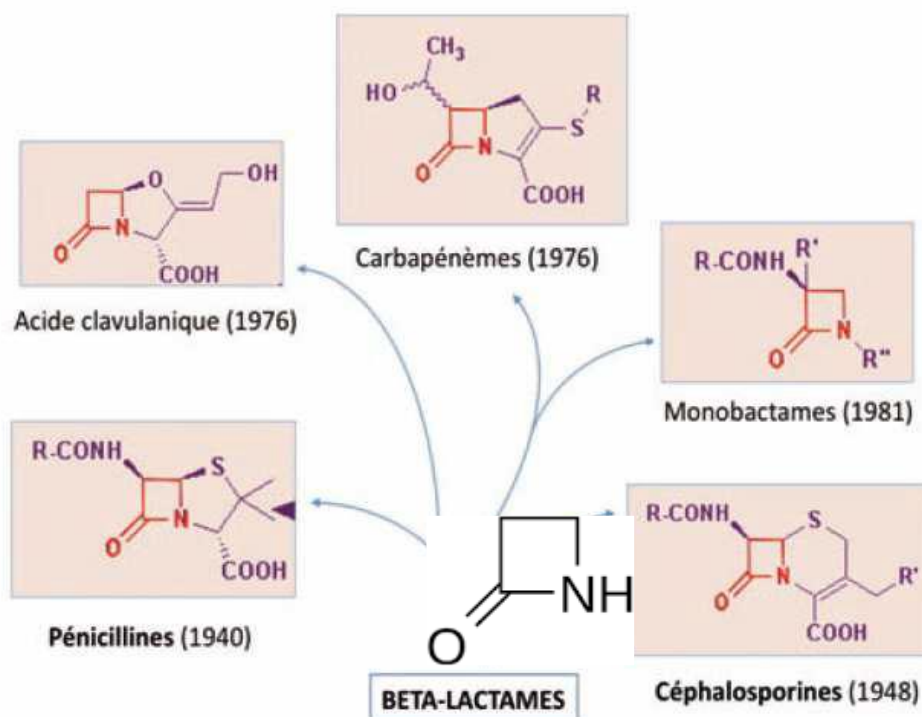
## II.4. Bêtalactamines :

### II.4.1. Définition

Les  $\beta$ -lactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité et à leur pouvoir bactéricide. Cependant, les entérobactéries hébergent naturellement et ont acquis des résistances limitant leur activité. (**F.Robin et al 2012)** Elles regroupent les pénicillines, les monobactames, les inhibiteurs des bêtalactamases, les céphalosporines et les carbapénèmes.

### II.4.2. Structure :

Les  $\beta$ -lactamines ont en commun une structure appelée le noyau  $\beta$ -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Ce noyau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (**Fisher et al. 2005**)



**Figure 7** : Structure des différentes classes de  $\beta$ -lactamines (**Fisher et al. 2005**)

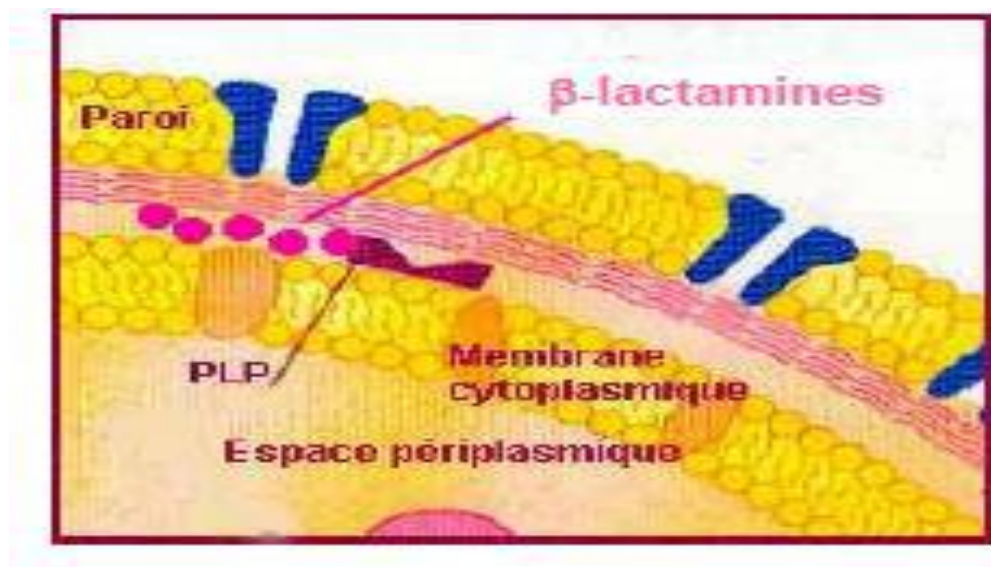
### II.4.3. Mode d'action des bêtalactamines :

L'enveloppe des entérobactéries comprend de l'extérieur vers l'intérieur, la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique.

Les cibles des bêtalactamines sont des protéines membranaires appelées « protéines de liaison aux pénicillines » (PLP) situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique.

Les bêtalactamines représentent une analogie structurale avec le D-Ala-D-Ala qui constitue le substrat naturel des PLP.

L'antibiotique se lie au site actif des PLP pour former un complexe pré-covalent, puis le cycle bêtalactame s'ouvre pour former une liaison covalente irréversible avec la serine active de la poche catalytique des PLP. L'inhibition des PLP induit un arrêt de la synthèse du peptidoglycane et de la croissance bactérienne (**R. Bonnet 2012**)



**Figure 8 :** Site d'action des bêtalactamines. (J-P Lavigne 2007) ;

#### II.4 .4. Classification des bêtalactamines :

**II.4 .4.1. Les pénicillines :** (noyau péname) dont font partie la pénicilline à spectre étroit (pénicilline G et V), la méticilline et les isoxazolylpénicillines (oxacilline et cloxacilline), les amino-benzylpénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam). (K Rahal 2013)

#### II.4.4.2. Les céphalosporines : (noyau céphème) :

Les céphalosporines sont des antibiotiques appartenant à la grande famille des bêtalactamines.

La mise en évidence de cette famille a été initiée en 1945 par le professeur BROTZU en Sardaigne, il a mis en évidence l'activité antibactérienne du filtrat d'un champignon dénommé *Cephalosporium acremonium*. Ces  $\beta$ -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. (J.D Cavallo et al 2004)

Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité :

- **Première génération (C1G):** Comme la céfalotine, céfaloridine, qui sont les céphalosporines les moins stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les bêta-lactamases.
- **Deuxième génération (C2G):** Comme le céfamandole, céfoxitine, sont caractérisées par une meilleure résistance aux  $\beta$ -lactamases à large spectre et un spectre d'action plus étendu au sein des entérobactéries, avec des variations selon les molécules.
- **Troisième génération (C3G):** Telles que céfotaxime, ceftazidime, elles se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des  $\beta$ -lactamases comme les pénicillinases et les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries.
- **quatrième génération (C4G):** Telles que ceftiprome, qui présentent une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites.

**II.4.4.3. Les carbapénèmes :** (noyau pénème) les molécules de cette famille actuellement commercialisées sont : l'Imipénème, l'Ertapénème, le Méropénème et le doripénème ; qui ont une grande stabilité envers la quasi-totalité des bêtalactamases.

**(J.D Cavallo et al 2004)**

Les carbapénèmes ont un usage exclusivement hospitalier, très souvent ce sont les dernières molécules actives de l'arsenal thérapeutique pour combattre les bactéries multirésistantes **(J.D Cavallo et al 2004)**

Mais actuellement il y a apparitions des souches productrices de carbapénémases.

**II.4 .4.4. Les monobactames :** (noyau azétidine) : représentés par l'aztréonam, qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3ème génération.

**II.4.4.5. Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases**

Ils existent également des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases : les clavanes (acide clavulanique) et les pénicillines-sulfones (tazobactam et sulbactam).

Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs des  $\beta$ -lactamases actives sur les pénicillines. Ils sont dépourvus d'activité antibiotique car ils n'inhibent pas les PLPs, ils sont utilisés en association avec d'autres  $\beta$ -lactamines (amoxicilline, ticarcilline et pipéracilline). **(Bru. JP 2015)**



# **CHAPITRE III : RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES**

---

CHAPITRE III : RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES

Les entérobactéries utilisent différents mécanismes d’antibiorésistance, il peut s’agir de :

- troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l’antibiotique dans la bactérie,
- systèmes d’efflux qui permettent d’évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie,
- modification de la cible bactérienne de l’antibiotique.
- Mais le plus souvent, il s’agit d’enzymes détruisant les bêtalactamines, les bêtalactamases. (Vora. S et Auckenthaler. R 2009)

III.1.Résistance naturelle chez les entérobactéries

Les entérobactéries possèdent des résistances naturelles vis-à-vis de grandes familles des antibiotiques hydrophobes :

- La famille des entérobactéries comme toutes les bactéries à gram négatif (BGN) sont résistantes naturellement aux Pénicilline G, oxacilline, macrolides (érythromycine), lincosamides (lincomycine), streptogramines (pristinamycine), acide fusidique et les glycopeptides (vancomycine) (Rahal K et al 2014)
- Pour les autres antibiotiques on note des variations dans le profil de la résistance naturelle selon le type d’espèce comme l’indique le tableau suivant :

**Tableau 3** : profil de la résistance naturelle aux antibiotiques chez les entérobactéries (Rahal K et al 2014)

Antibiotique Espèce	AMP/ AMX	AMC	TIC/ PIP	C1G	FOX	GEN	TCY	COL	NIT
<i>Klebsiella spp</i>	R		R						
<i>C.koseri</i>	R		R						
<i>C.freundii</i>	R	R		R	R				
<i>E.cloacae</i>	R	R		R	R				
<i>E.aerogenes</i>	R	R		R	R				
<i>S.marcesens</i>	R	R		R				R	
<i>P.mirabilis</i>							R	R	R
<i>P.vulgaris</i>	R			R			R	R	R
<i>M.morgani</i>	R	R		R			R	R	R
<i>P.stuartii</i>	R	R		R		R	R	R	R
<i>Y.enterocolitica</i>	R	R	R	R	R				

R : résistance naturelle

### III.1.1. Phénotype de résistance naturelle des entérobactéries aux bêtalactamines :

Le comportement des entérobactéries vis-à-vis de plusieurs bêtalactamines a permis de caractériser dans les années 1980, quatre phénotypes de résistance naturelle répartis en 4 groupes de G1 à G4: G1 (sensible), G2 (pénicillinase de bas niveau), G3 (céphalosporinase) et enfin G4 (pénicillinase + céphalosporinase).

Actuellement, l'identification de nouvelles bêtalactamases produites par certaines espèces d'entérobactéries a amené à proposer jusqu'à sept phénotypes de résistance naturelle allant de G0 à G6 (groupe 0 au groupe 6) : **(A. Philippon et G. Arlet 2012)**

#### **Groupe 0 : phénotype « sensible »**

Les bactéries du genre *Salmonella* et l'espèce *Proteus mirabilis* sont naturellement sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines et dépourvues de  $\beta$ -lactamase à l'état « sauvage ». **(R. Bonnet 2012)**

#### **Groupe 1 : Céphalosporinase constitutive de classe C**

*E.coli*, *Shigella spp* sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréidopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC qui peut entraîner, chez certaines souches, une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux C1G. **(R. Bonnet 2012)**

#### **Groupe 2 : pénicillinase de bas niveau**

*K. pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Escherichia hermanni* produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes (pénicillinases) chromosomiques de classe A sensibles aux inhibiteurs de bêtalactamase ; Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux uréidopénicillines. **(R. Bonnet 2012, F. Robina et al 2012)**

#### **Groupe 3 : Céphalosporinase de bas niveau inductible de classe C**

*H. alvei*, *P. rettgi* et *P.agglomerans* sont souvent sensibles à la céfoxitine et au céfuroxime. *Serratia marcescens* et *Morganella morganii* sont plus sensibles à la

céfoxitine que le genre *Enterobacter* et l'espèce *C. freundii*.

Ces entérobactéries produisent une céphalosporinase inductible *AmpC* ; elle est régulée par un facteur de transcription *AmpR* et inductible par les  $\beta$ -lactamines.

Le phénotype de résistance est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines seules ou associés aux inhibiteurs et une résistance aux C1G alors que la résistance aux C2G est variable. **(R. Bonnet 2012, A. Philippon et G. Arlet 2012)**

#### **Groupe 4 : Céphalosporinase de classe C et pénicillinase de classe A**

*Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola* produisent une céphalosporinase inductible de classe C et une enzyme de classe A. *Y. enterocolitica* est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux C1G.

Le phénotype de résistance de *S. fonticola* est similaire. Cependant, le céfuroxime n'est pas actif et la résistance à l'association aminopénicillines-B-lactamines inhibitrices qui devrait normalement être induite par l'enzyme AmpC, ne s'exprime pas ou à très bas niveau in vitro **(R. Bonnet 2012, F. Robina et al 2012)**

#### **Groupe 5 : Céphalosporinase de classe A inductible**

*P. vulgaris* et *P. penneri* produisent naturellement une céphalosporinase de classe A chromosomique inductible par les Bétalactamines souvent appelée céfuroximase.

Le phénotype se caractérise par une résistance aux aminopénicillines, aux C1G, aux C2G (céfuroxime, céfamandole) à l'exception des céphamycines (céfoxitine) et une sensibilité aux associations pénicillines-inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. **(R. Bonnet 2012)**

#### **Groupe 6 : Céphalosporinase de classe A inductible**

*K. ascorba*, *K. Cryocrescens*, *K. Georgina*, *R. Aqualitis*, *C. Sedlakii*, *E. persicina* produisent naturellement des B-lactamases à spectre étendu inductible de classe A. Ces BLSE souvent exprimée à bas niveau, confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception des céphamycines. La résistance aux uréidopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensible » en « intermédiaire » pour les pénicillines, de même pour les C3G si le test de synergie est positif. **(R. Bonnet 2012)**

**Tableau 4 :** Groupes d'entérobactéries selon la résistance naturelle aux bêtalactamines. (A. Philippon et G. Arlet 2012)

Groupes	Gr 0	Gr 1	Gr 2	Gr 3	Gr 4	Gr5	Gr 6
Mécanisme de résistance	Sensible	Céphalosporinase de classe C non inductible	Pénicillinase de bas niveau	Céphalosporinase de bas niveau	Céphalosporinase de classe C et pénicillinase de classe A	Céphalosporinase de classe A inductible = céfuroximase	BLSE chromosomique de bas niveau
Entérobactéries	<i>Salmonella spp</i> - <i>P.mirabilis</i>	<i>E.coli</i> <i>Shigella spp</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>K.oxytoca</i> <i>C. koseri</i> <i>C. amalonaticus</i> , <i>E.hermani</i>	<i>E.cloacae</i> <i>E.acrogenes</i> <i>C.freundii</i> <i>M.morganii</i> <i>H.Alvei</i> <i>P. rettgeri</i> <i>P.agglomerans</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Serratia Fonticola</i>	<i>P.Vulgaris</i> <i>P.peneri</i>	<i>K. ascorba</i> <i>K.Cryocrescens</i> <i>K.Georgina</i> <i>R.Aqualitis</i> <i>C.Sedlakii</i> <i>E.persicina</i>
AminoP	S	S/I <sup>a</sup>	R	R	R	R	R/I→I
AminoP+CLA	S	S/I <sup>a</sup>	S	R	R	S	S/I <sup>a</sup>
CarboxyP	S	S	R	S	R	S	R/I→I
CarboxyP+CLA	S	S	S	S	S	S	S
UréidoP	S	S	S→I <sup>c</sup>	S	S→I <sup>c</sup>	S	I/S ? I
UréidoP+TZA	S	S	S	S	S	S	S
C1G	S	S/I <sup>a</sup>	S	R	R	R	R/I
C2G	S	S	S	R/I/S <sup>b</sup>	S	R	R/I/I→I
Céfoxitine	S	S	S	R/I/S <sup>b</sup>	S	S	S
C3G	S	S	S	S	S	S	S → I <sup>d</sup> /I
C4G	S	S	S	S	S	S	S → I <sup>d</sup> /I
Carbapénèmase	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup>S/I : sensible ou intermédiaire (résultat en fonction de l'espèce et de l'isolat)

<sup>b</sup> R/I/S : résistante ou intermédiaire ou sensible (résultat en fonction de l'espèce et de l'isolat)

<sup>c</sup> S→I : tous les résultats sensibles interprétés intermédiaires

<sup>d</sup> S→I : tous les résultats sensibles interprétés intermédiaires si le test de synergie est positif pour au moins une C3G, une C4G, ou l'aztréonam.

### III.2. La multirésistance et l'ultrarésistance chez les entérobactéries :

En plus des mécanismes de résistance naturelles dont sont dotées les entérobactéries, elles peuvent acquérir des mécanismes d'antibiorésistance dits acquises, le cumul de ces mécanismes mène à un état de multirésistance voire d'ultrarésistance ou de totorésistance. (C. Bellini et N. Troilet 2016)

#### III.2.1. Définitions :

##### III.2.1.1. Entérobactérie multirésistante MDR :

Une entérobactérie doit être considérée comme multirésistante ou MDR (multi-drug resistant) si elle est résistante à TROIS OU QUATRE des SIX groupes d'agents antibiotiques énumérés ci-dessous :

- Tobramycine OU gentamicine
- Pipéracilline-tazobactam
- Imipénème OU méropénème
- Céfotaxime OU ceftriaxone OU ceftazidime
- Ciprofloxacine
- Triméthoprim-sulfaméthoxazole (G-J German et al 2018)

##### III.2.1.2. Entérobactérie ultrarésistante XDR :

Une entérobactérie doit être considérée comme ultrarésistante ou XDR (extensively-drug resistant bacteria) si elle est résistante à CINQ OU SIX des SIX groupes d'agents antibiotiques énumérés précédemment (G-J German et al 2018)

c'est le cas des entérobactéries productrices des carbapénémases qui sont dites BHRe dont voici la définition exacte :

Les « bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes » (BHRe) ont été définies par le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) en juillet 2013 comme des bactéries commensales du tube digestif, résistantes à de nombreux antibiotiques, avec des mécanismes de résistance aux antibiotiques transférables entre bactéries, porteuses de mécanismes de résistance émergents selon l'épidémiologie connue. (J. Gagnaire et al 2015, S. Fournier 2014, L. BERNARD 2015)

### III.2.2. Les principaux mécanismes de la multi et l'ultrarésistance chez les entérobactéries :

La multi et l'ultrarésistance des entérobactéries ont comme principale mécanisme d'antibiorésistance un mécanisme enzymatique par sécrétion de bêtalactamase à savoir :

- \* la production d'une bêtalactamase à spectre élargi,
- \* une dérégulation de leur céphalosporinase chromosomique (céphalosporinase hyperproduite)
- \* une production de carbapénèmase.

#### III.2.2.1. Rappel sur les bêtalactamases

##### III.2.2.1.1. Définition des bêtalactamases :

Pour rappel les  $\beta$ -lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes constitutionnelles ou acquises capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines.

L'inactivation survient après ouverture du cycle  $\beta$ -lactame par l'enzyme.

L'enzyme hydrolyse le pont amide du cycle  $\beta$ -lactame pour donner une acyl-enzyme qui sera ensuite dégradée en acide inactif (figure 9).

Elles constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines (D. Vodovara et al 2013)

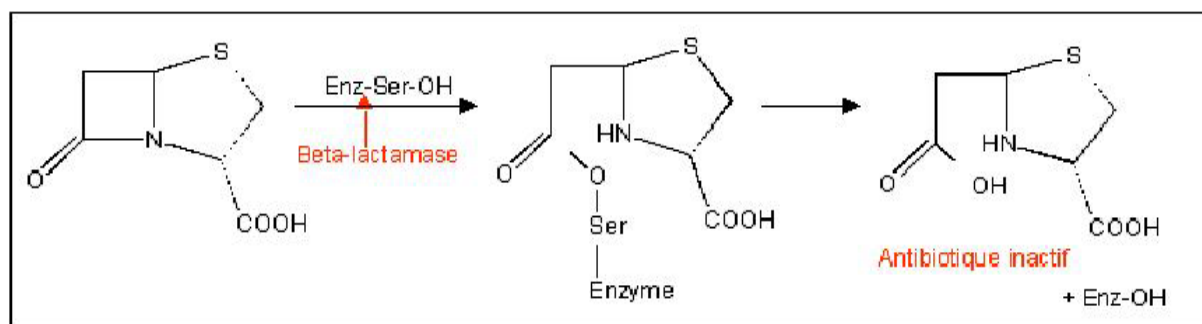


Figure 9 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle bêta-lactame (K. Barrial et J. Scotet 2006).

### III.2.2.1.2. Classification des bêtalactamases :

Les deux classifications couramment utilisées pour « classer » les bêtalactamases sont celle d'Ambler et celle de Bush, Jacoby et Medeiros.

#### ◆ La classification structurale d'Ambler :

est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique et distingue quatre classes.

\*La classe A : correspond aux « pénicillinases » inhibées par l'acide clavulanique ;

\*la classe B : correspond aux métallo-bêtalactamases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ;

\*la classe C : regroupe les « céphalosporinases » inhibées par la cloxacilline ;

\*la classe D : correspond aux oxacillinases de sensibilité variable à l'acide clavulanique.

Les enzymes des classes A, C et D sont des enzymes à sérine active. En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo-enzyme à zinc (enzymes ayant au moins un atome de zinc dans leur site actif). **(R. Bonnet 2012)**

#### ◆ La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros :

repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des bêtalactamases aux inhibiteurs.

Définit quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes.

Elle rend compte de leur diversité fonctionnelle au sein des quatre classes structurales d'Ambler, notamment dans sa classe A **(D. Vodovara et al 2013)**

Le tableau suivant récapitule ces deux classifications :



**Tableau 5:** Classification des  $\beta$ -lactamases d'après Ambler et Bush (**originale**)

Classification		Type de $\beta$ -lactamase et exemples représentatives	Activité inhibitrice		Activité enzymatique	
Moléculaire (Ambler)	Fonctionnel (Bush)		Clavulanate	EDTA	$\beta$ -lactamines hydrolysées	$\beta$ -lactamines stables
<b>Enzyme à sérine</b>						
<b>Classe A</b>	2a	Pénicillinasés à spectre restreint	+++	-	Pénicillines	Pénicillines M, C1G, Carbapénèmes
	2b	$\beta$ -lactamase à large spectre : TEM-1&2, SHV-1 plasmidiques et chromosomiques	+++	-	pénicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztreonam
	2be	$\beta$ -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztreonam SHV-2 à 9, TEM-3 à 29, VEB-1, plasmidiques	+++	-	Idem 2b + C3G et aztreonam	Céphamycines, moxalactam, Carbapénèmes
	2br	$\beta$ -lactamases à large spectre résistant à l'ac clavulanique TRI : dérivé TEM-30 à -41, plasmidiques	-	-	Idem 2b + associations aux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillases PSE-1, PSE-3, PSE-4 plasmidiques	+		Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinasés chromosomiques inhibés par l'acide clavulanique – Cefuroximase Cum A ( <i>P. vulgaris</i> ), - L2 ( <i>S. maltophilia</i> )	+++	-	Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G, certaines C3G	Ceftazidime, céphamycines, aztreonam, carbapénèmes
	2f	Carbapénémases à site actif sérine et inhibés par l'acide clavulanique Ex : IMI-1, NMC-A, chromosomiques	+	-	Idem 2b + aztreonam, carbapénèmes et certaines C3G	Certaines C3G
<b>Classe C</b>	1	Céphalosporinase AmpC chromosomiques et plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR-1...)	-	-	Toutes les $\beta$ -lactamines sauf les carbapénèmes	Carbapénèmes
<b>Classe D</b>	2de	Oxacillinasés OXA plasmidiques et chromosomiques	-	-	Idem 2b	Variable
<b>Pas de classe attribuée</b>	4	Enzymes indéterminées Ex : enzymes chromosomiques de <i>C. jejuni</i> , <i>C. cepacia</i> ...	?	-	Variable	Variable
<b>Métallo-enzyme à zinc</b>						
<b>Classe B</b>	3	Carbapénémases VIM IMP & NDM	-	+	Large profil de substrats (sauf aztréonam)	Variable

Inhibition : inhibiteur fort++, inhibiteur modéré+, négligeable -, V : variable

### III.2.2.2. Les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargie BLSE :

-Les BLSE sont des enzymes à large spectre, appartenant en majorité aux classes A de la classification d'Ambler et 2<sup>de</sup> de Bush-Jacoby-Medeiros.

Certains auteurs considèrent également les bêtalactamases des classes D et 2<sup>de</sup> (de type OXA) comme des BLSE (**Vodovara et al 2013**)

Les gènes codant pour ces enzymes sont principalement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons...), expliquant la rapidité de leur diffusion. (**Z. Baba Ahmed-Kazi Tani et G. Arlet 2014, N. Grall et al 2011**)

Elles confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1<sup>ere</sup>, 2<sup>eme</sup> et 3<sup>eme</sup> génération et à certaine céphalosporine de 4<sup>eme</sup> génération ou à l'aztréonam, elles sont inhibées par l'acide clavulanique.

A l'inverse, les entérobactéries productrices de BLSE restent habituellement sensibles aux céphamycines (cefoxitine) et aux carbapénèmes

Cependant, le phénotype de résistance varie avec la nature de la BLSE produite et selon leur niveau de production. (**CSS 2017, F. Robina et al 2012**)

Les souches d'entérobactéries productrices de BLSE sont, dans leur très grande majorité, aussi résistantes aux autres familles d'antibiotiques, notamment aux fluoroquinolones et au cotrimoxazole (**M.-H. Nicolas-Chanoine 2012**)

Les types de BLSE produites par les Enterobacteriaceae :

#### **a. BLSE de type TEM :**

Les BLSE de type TEM (Temoniera, nom du patient) est fréquemment retrouvés chez *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*. La majorité de ce type de BLSE dérive des mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2) qui rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G (**Cattoir Vincent, 2008**).

#### **b. BLSE de type SHV :**

Les BLSE de type SHV (Sulphydryl variable) ont été détectées parmi de nombreuses Entérobactéries notamment *K. pneumoniae*. (**V. Cattoir 2008, L. Poirel et al 2008**)

#### **c. BLSE de type CTX-M :**

Les BLSE de type CTX-M (Céfotaximases-Munich) hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases. Elles confèrent une résistance marquée au céfotaxime.

Il semble qu'elles dérivent des céphalosporinases chromosomiques des bactéries du genre *Kluyvera*, qui sont des entérobactéries non pathogènes environnementales (V. Cattoir 2008)

#### d. BLSE de type OXA :

Les BLSE de type OXA (Oxacillinase) sont caractérisées par une grande activité catalytique vis à vis des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline). Les oxacillinases hydrolysent la céftazidime mieux que le céfotaxime (V. Cattoir 2008)

#### e. Autres types de BLSE :

Il existe d'autres types de BLSE mais qui sont très rares.

\*BLSE type PER (Pseudomonas extended resistance)

\*BLSE type VEB L'enzyme VEB-1 (Vietnamiense extended-spectrum  $\beta$ -lactamase -1)

\*BLSE type GES (Guyana extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)

\*BLSE type SFO (*Serratia fonticola*).

\*BLSE type TLA L'enzyme TLA-1 (TEM Like Activity) (V. Gautier 2007).

#### III.2.2.4. Les entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinases :

Un certain nombre d'entérobactéries sont naturellement résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline - acide clavulanique et à la céfalotine (+/- certaines céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération) par sécrétion d'une céphalosporinase chromosomique.

Cette céphalosporinase est codée par le gène *ampC*. La production de cette enzyme est sous le contrôle d'un système régulateur inductible codé principalement par deux gènes : *ampD*, *ampR* ;

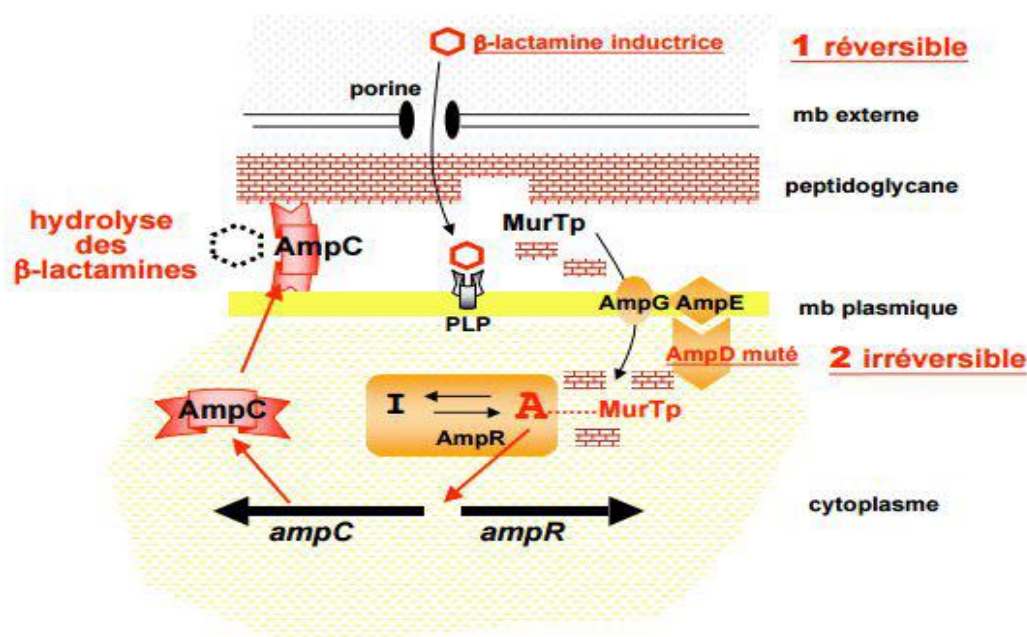
Le niveau d'expression du gène *ampC* est contrôlé par le gène *ampR*, répresseur.

A l'état normal, le niveau d'expression de la céphalosporinase est faible.

Une augmentation transitoire et réversible de la production de la céphalosporinase peut être observée en présence d'antibiotiques inducteurs comme la céfoxitine ou l'imipénème.

*AmpD* a un effet inhibiteur sur *AmpR*. Des mutations dans la protéine *AmpD* aboutissent à l'hyperproduction constitutive d'*AmpC* par levée de l'inhibition du répresseur *AmpR*. Cette sécrétion peut être augmentée alors d'un facteur d'environ 1000. (Z Baba Ahmed-Kazi Tani , G Arlet 2014)

**Production d'AmpC :  $\beta$ -lactamine inductrice ou mutation d'*ampD***



**Figure 10** : Schéma explicatif des mécanismes de production d'AmpC (M. Griton 2009)

Ces souches mutantes deviennent alors résistantes aux céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et de 3<sup>ème</sup> génération. Seul le Céfépime, parmi les céphalosporines, reste actif.

Cependant elles ne confèrent généralement pas de résistance aux carbapénèmes et aux C4G.

Elles sont habituellement non inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'acide clavulanique ou le tazobactam ni par l'EDTA. (R. Bonnet 2012)

### III.2.2.5. Les entérobactéries productrices de carbapénèmes (EPC)

Les EPC sont classées parmi les Bactéries Hautement Résistantes Emergentes (BHRe). Trois caractéristiques définissent les EPC comme des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergents (BHRe):

- \* l'émergence,
- \* la multirésistance aux antibiotiques avec transfert plasmidique des gènes de résistance entre espèces d'entérobactéries commensales du tube digestif,
- \* le risque de diffusion épidémique en milieu hospitalier mais aussi communautaire (D. Lepelletier et al 2015)

la production d'enzymes de résistances appelées carbapénèmases permettant à la bactérie de résister aux antibiotiques de la famille des carbapénèmes (értapénème, méropénème, imipénème) lesquels constituent souvent notre dernière arme dans l'arsenal des antibiotiques disponibles pour traiter les infections (INSPQ 2016, S. Boivin et al 2016)

Les carbapénèmases décrites chez les entérobactéries appartiennent aux trois classes connues de bêtalactamases (classe A, B et D de la classification de Ambler). (P. Nordmann et A. Carrer 2010) dont les différences ont non seulement un intérêt génétique et biochimique, mais aussi clinique, car le profil de résistance et l'épidémiologie de ces souches diffèrent. (P. Nordmann 2013)

Actuellement, les carbapénèmases les plus importantes en microbiologie clinique sont : les carbapénèmases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapenemases) (classe A), les métallobêtalactamases (classe B) de type : VIM (Verona Integron Métallo -lactamase), IMP (imipenemase) et plus récemment NDM (New Delhi métallobêtalactamase), et les oxacillinases (classe D) de type OXA-48 (L. Dortet et al 2013)

La plupart des carbapénèmases hydrolysent les bêtalactamines et les céphalosporines, mais aussi les monobactames et les carbapénèmes (P. Nordmann 2013)

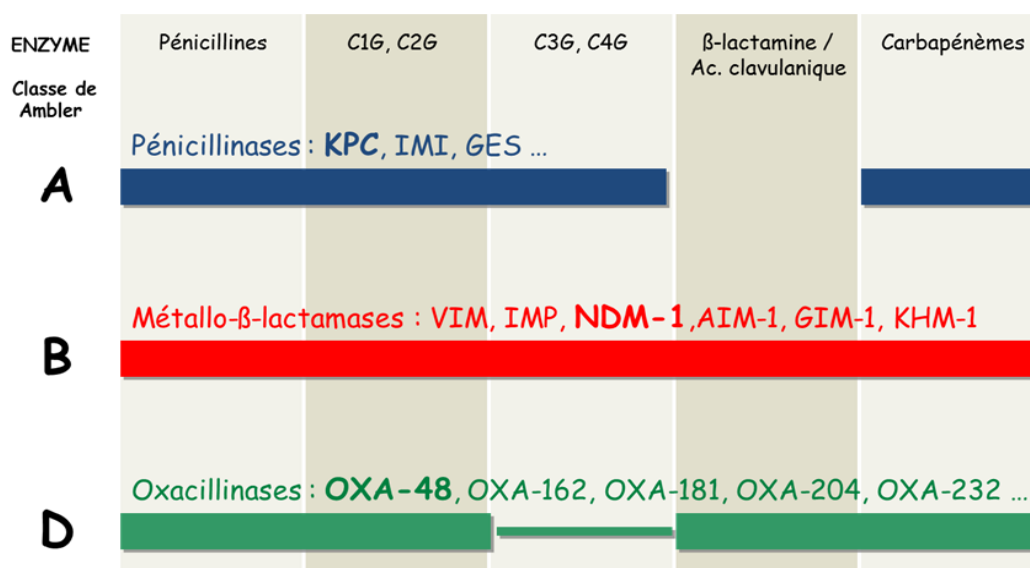


Figure 11: Spectre d'activité des carbapénèmases chez les Enterobacteriaceae. (P. Nordmann 2013)

**Remarque** : Pour les carbapénèmases de classe D (oxacillinase) le spectre d'activité est variable on note une faible inhibition de C3G et C4G

❖ **+Les carbapénèmases de classe A :**

-Les principales carbapénèmases qui appartiennent à la classe A de Ambler sont les enzymes de types NmcA (non-métallo carbapénèmase A), IMI (imipenem hydrolysing- $\beta$ -lactamase), et celles de type SME (*Serratia marcescens* enzyme) qui sont codées par des gènes chromosomiques ; et aussi les carbapénèmases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase) et GES (Guyana extended-spectrum) qui sont codées par des gènes plasmidiques. (**G. Cuzon et al 2010, L. Dortet et al 2013**)

-ces enzymes sont capables d'hydrolyser une grande variété de bétalactamines, dont les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes. (**P. Nordmann 2013**)

-Elles ont la particularité de voir leur activité in vitro totalement ou partiellement inhibée par l'acide boronique et l'acide clavulanique (**A. BOUTET-DUBOIS et al 2012, INSPQ 2010**)

❖ **Carbapénèmases de classe B (métallo-B-lactames)**

-Correspondent aux métallo- $\beta$ -lactamases de type VIM, IMP et NDM.

-Ces enzymes hydrolysent très fortement toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité in vitro n'est pas affectée par les inhibiteurs suicides de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique et tazobactam).

-Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent un ion zinc dans leur site actif expliquant l'inhibition de leur activité par l'EDTA (chélateur des cations divalents) ou l'acide dipicolinique. (**A. BOUTET-DUBOIS et al 2012, L. Dortet et al 2013**)

L'une des métallo-bétalactamases les plus connues actuellement est NDM-1 (pour New Delhi métallo-bétalactamase) (**P. Nordmann 2013**). Le gène codant pour cette enzyme, *bla*NDM-1, n'est pas associé à un plasmide en particulier et ces plasmides portent souvent d'autres gènes de résistance pouvant conférer une pan-résistance. (**M. ABBAS et al. 2012**) On peut trouver ce gène sur un chromosome.

❖ **Carbapénèmases de classe D (les oxacillinases de types OXA-48)**

-Correspondent essentiellement aux enzymes de type oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181). (**A. BOUTET-DUBOIS et al 2012**)

L'activité carbapénémase de ces enzymes est faible, et elle n'est inhibée ni par les inhibiteurs commerciaux de bêtalactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam), ni par l'EDTA. En revanche, leur activité carbapénémase peut être inhibée in vitro par le NaCl (**L. Dortet et al 2013**).

En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres bêtalactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique...), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes.

Toutefois, leur présence est souvent couplée à la présence d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), ce qui conduit à une multirésistance des souches sécrétrices. (**A. BOUTET-DUBOIS et al 2012**),

L'OXA-48 est retrouvé que chez les entérobactéries le gène codant pour cette enzyme est situé sur un transposon et encadré par deux séquences d'insertion identiques jouant un rôle dans la mobilité et l'expression du gène (**N. Grall et al 2011**)

**Tableau 6** : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et profil d'inhibition chez les entérobactéries productrices de carbapénemases. (P-N. Sridhar Rao 2012)

Classe moléculaire	Groupe fonctionnel	Type d'enzyme	Profil d'hydrolyse					Profil d'inhibition	
			pénicilline	Céphalosporine	Céphalosporine à large spectre	Aztréonam	Carbapénème	EDTA	Acide clavulanique
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	+/-	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	+/-	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
		NDM	+	+	+	+/-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	+/-	-	+/-	-	-



### III.3. La totorésistance chez les entérobactéries PDR :

#### III.3.1. Définition :

Il y'a eu par ailleurs la description des souches dites pan-résistantes (PDR pan-drug resistant bacteria) ou totorésistantes c'est à dire résistantes à tous les antibiotiques il s'agit des entérobactéries ultrarésistantes qui ont développé une résistance à la colistine ou ceux qui possèdent déjà une résistance naturelle à la colistine comme le genre *Proteus*. (F. CARON 2017)

#### III.3.2. Mécanismes de la totorésistance chez les entérobactéries :

La résistance à la colistine peut être isolée mais est généralement liée à la production de BLSE et de carbapénèmases et donc s'inscrit dans un cumul de mécanismes aboutissant à la totorésistance.

La résistance des entérobactéries vis-à-vis de la colistine est principalement due à une modification enzymatique du lipopolysaccharide (LPS), laquelle tend à réduire son affinité pour la colistine par substitution des groupements phosphates du lipide A par des groupements cationiques 4-amino-4-désoxy-L-arabinose ou de phospho-éthanolamine. (S. Schwarz et J. Alan 2016, L. Poirel 2017)

Ces modifications sont catalysées par des enzymes conservées au sein des espèces bactériennes, dont l'expression est augmentée suite à l'altération de gènes chromosomiques régulateurs qui codent pour le système à deux composants PmrAB et PhoPQ. (W. Theriault 2013)

La surexpression de systèmes des pompes efflux et un piégeage capsulaire peuvent également conférer la résistance aux polymyxines. (K. Hjort et al 2016) (A. Olaitan 2015)

En novembre 2015 le premier mécanisme de résistance plasmidique à la colistine et donc transférable a été découvert il s'agit du gène MCR-1 codant pour une enzyme qui modifie la charge portée par une région du LPS qui devient moins sensibles à la colistine. (C. Von Wintersdorf et al 2016, L. Poirel et al 2017)

En juin 2016, un nouveau gène de résistance à la colistine a été décrit MCR-2 suivi de la description d'autres gènes plasmidiques MCR-3, MCR-4, MCR-5 et leur variantes. (Y. Glupcynski 2017, R. Bonnet 2018)

**CHAPITRE IV : METHODES DE CARACTERISATION  
PHENOTYPIQUE DES MECANISMES  
D'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROBACTERIES**

---

## **CHAPITRE IV: METHODES DE CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MECANISMES D'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROBACTERIES**

### **IV.1. Caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux antibiotiques :**

#### **IV.1.1. Définition :**

Les méthodes phénotypiques sont basées sur l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.

Le résultat est habituellement rendu sous une forme qualitative : sensible, intermédiaire ou résistant.

Il est généralement obtenu à partir des méthodes de diffusion en milieu solide, permettant de passer en revue d'éventuelles résistances et de détecter des activations enzymatiques telles les bêta-lactamase : BLSE, CHN, carbapénèmases, ainsi que le typage des carbapénèmases tel que la détection des métallos-carbapénèmases.

Le résultat peut également être rendu sous une forme quantitative par la concentration minimale inhibitrice (CMI). (C. Billy 2003)

#### **IV.1.2. Intérêt :**

-La caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques permet de guider le traitement.

Elle garde son intérêt aussi dans les études épidémiologiques et préventives

-Les tests phénotypiques présentent l'avantage d'être moins coûteux, faciles à mettre en œuvre, et ils sont capables de détecter l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance.

#### **IV.1.3. Limites :**

Les tests phénotypiques sont des méthodes non moléculaires qui ont une sensibilité et une spécificité limitées, donc il faut les associer à des méthodes génotypiques qui sont les méthodes de références

### **IV.2. Etude de la sensibilité in vitro des entérobactéries aux antibiotiques :**

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques chez les entérobactéries est réalisée par l'antibiogramme standard par différentes méthodes selon les recommandations du CLSI. (K. Rahal et al 2014) Voici ci-après leurs principes :

#### **IV.2.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par méthode de diffusion en gélose:**

C'est une technique qualitative souvent utilisée en pratique courante car elle permet de mesurer simultanément la sensibilité des entérobactéries à différents antibiotiques

Principe :

Le principe de cette méthode consiste à déposer différents disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique à la surface d'une gélose MUELLER-HINTON; préalablementensemencée d'une suspension bactérienne standardisée. Chaque antibiotique testé diffuse sur la gélose et peut inhiber la croissance de la souche en créant un cercle plus ou moins grand autour du disque selon son niveau de sensibilité. Après 24h d'incubation à 35°C, le diamètre de la zone d'inhibition de croissance autour de chaque disque d'antibiotique est mesuré et interprété selon les critères publiés par diverses institutions. (J. Beauregard 2012)

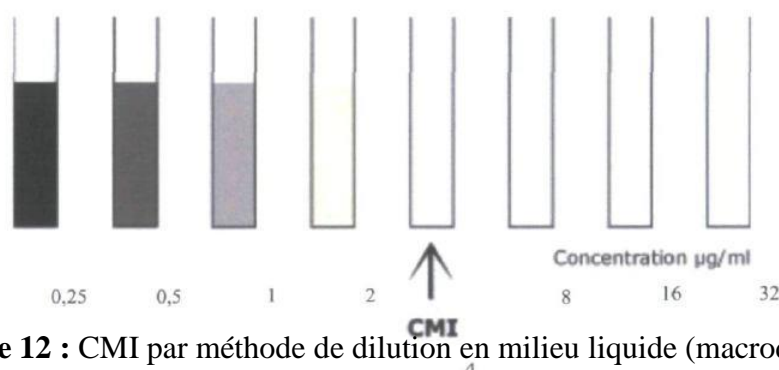
Technique et interprétation : voir annexe III.1

**IV.2.2. Détermination des CMI par méthode de dilution en milieu liquide :**

C'est une technique quantitative, c'est la méthode de référence qui permet de mesurer précisément la concentration minimale inhibitrice CMI qui est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute culture visible à l'œil nu après 24h d'incubation.

Principe :

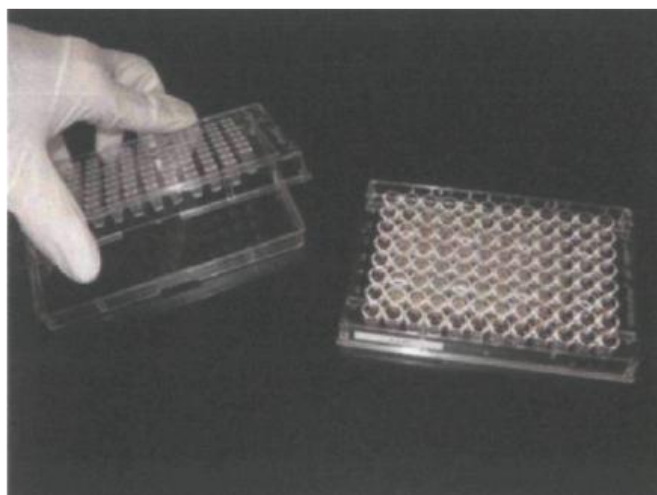
Pour ce faire, un volume constant de MUELLER-HINTON liquide est réparti dans une dizaine de tubes. Un inoculum d'une suspension bactérienne standardisée et des doubles dilutions d'un antibiotique sont ensuite ajoutés dans chacun des tubes. Après 24h d'incubation à 35 °C, le premier tube dans lequel il n'y a plus de croissance bactérienne indique la valeur de la CMI en ug/ml (J-H. Jorgensen et M-J. Ferraro 2009)



**Figure 12 :** CMI par méthode de dilution en milieu liquide (macrodilution) (J.Beauregard 2012)

Technique et interprétation: voire annexe III.2

Il existe une variante de cette méthode, c'est la technique de « microdilution » réalisée dans des microplaques à puits. Ses principaux avantages sont de pouvoir tester la sensibilité bactérienne à plusieurs antibiotiques simultanément, de réaliser des économies de réactifs et d'espace et la commodité d'avoir des microplaques préparées disponibles commercialement .



**Figure 13:** plaques de microdilution pour la détermination des CMI (J-H. Jorgensen et M-J. Ferraro 2009)

#### **IV.2.3. Détermination des CMI par méthode de dilution en gélose :**

##### Principe :

C'est une technique quantitative. Elle consiste à préparer une série de géloses contenant une concentration croissante d'un antibiotique donné. La souche bactérienne peut être ensemencée sur ces géloses. Après 24h d'incubation à 35°C, la valeur de la CMI est déterminée. La CMI pour chaque souche étudiée est ensuite comparée aux concentrations critiques et permet d'être classée dans une catégorie de résistance. (J. Beauregard 2012)

Technique et interprétation: voir annexe III.3

#### **IV.2.4. Détermination des CMI par méthode E-Test :**

##### Principe :

La mesure de la sensibilité aux antibiotiques par la technique E-test repose sur les méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide ;

Elle requière l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel d'antibiotique pour mesurer la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne.

Il s'agit d'une technique qualitative avec une interprétation en catégorie thérapeutique (sensible, intermédiaire, résistant), mais aussi quantitative car elle permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique par diffusion en milieu gélosé. (**J. Beauregard 2012**)

Technique et interprétation: voir annexe III.4

#### **IV.2.5. Cas particulier : Les tests de susceptibilité à la colistine (polymyxine E) chez les entérobactéries :**

Malgré un tel long terme d'utilisation clinique (décennies), la méthode optimale pour les tests de susceptibilité à la colistine reste encore indéfinie. Les difficultés à tester la susceptibilité à la polymyxine E sont diverses, notamment une mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose, les propriétés cationiques inhérentes aux polymyxines, la présence d'hétérorésistance aux polymyxines chez de nombreuses espèces.

Cependant, l'émergence récente de BGN multirésistants et l'utilisation accrue de colistine ont incité la communauté scientifique à développer des méthodes rapides et fiables pour déterminer la sensibilité des isolats à la colistine, car il s'agit maintenant d'un besoin urgent dans les laboratoires cliniques (**L. Poirel et al 2017, Y. Devi Bakthavatchalam et al 2017**)

##### **IV.2.5.1. Microdilution en bouillon (BMD)**

Une méthode de référence pour les tests de sensibilité à la colistine a été définie, il s'agit de la méthode de microdilution en bouillon (BMD : broth microdilution),

C'est actuellement la seule méthode approuvée pour la détermination de la CMI de la colistine par le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antibiotiques (EUCAST) et l'Institut de normalisation clinique et de laboratoire (CLSI). (**Y. Devi Bakthavatchalam, et al 2017, L. Poirel et al 2017**)

Principe :

C'est une technique dans laquelle une suspension bactérienne à une concentration prédéterminée est testée contre diverses concentrations de la colistine dans des plaques de microtitration à 96 puits avec une formulation prédéterminée. (**L. Poirel et al 2017, A. Jayol et al 2017**)

Technique : voir annexe IV

Avantages :

La BMD reste actuellement la méthode de référence pour la détermination des CMI en raison de sa reproductibilité, fiabilité, et possibilité d'automatisation (**L. Poirel et al 2017**)

Inconvénients :

BMD standard est difficile à effectuer dans les laboratoires de routine car elle nécessite un personnel qualifié, prend du temps et nécessite une préparation manuelle de solutions d'antibiotiques.

De plus, cette méthode présente des limites d'évaluation de l'hétérorésistance (**A. Jayol et al 2017**)

- L'EUCAST et le CLSI ont joint leurs recommandations en ce qui est les concentrations critiques (break point) pour la colistine : sensible si  $\leq 2 \mu\text{g} / \text{ml}$  et résistant si  $> 2 \mu\text{g} / \text{ml}$  (Tableau 7).

(**L. Poirel, et al 2017, Y. GLUPCZYNSKI et al 2017**)

**Tableau 7** : Break point pour la colistine recommandée par les lignes directrices du CLSI et de l'EUCAST en 2017 chez les entérobactéries (**EUCAST 2016**)

	CLSI/EUCAST joint groupe	
	S	R
CMI	$\leq 2$	$>2$

### **IV.3. Tests phénotypiques pour la recherche des principaux mécanismes enzymatiques de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries:**

#### **IV.3.1. Méthodes phénotypiques appliquées à la recherche de BLSE :**

La détection phénotypique de la BLSE garde son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

Les BLSE entraînent une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des monobactames (aztréonam), mais n'ayant aucune activité vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, moxalactam) ni des carbapénèmes.

Donc pour les entérobactéries après l'antibiogramme on recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

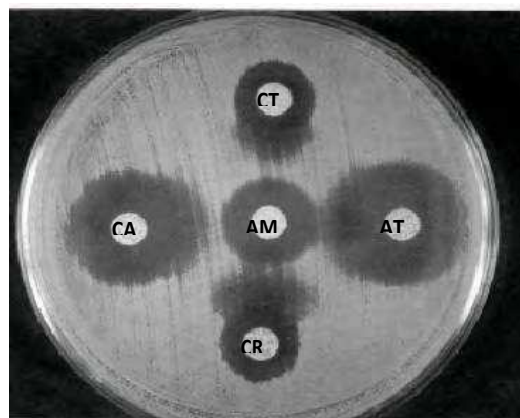
Céfotaxime (CTX < 27mm) ou Céftriaxone (CRO < 25mm) (K. Rahal et al 2014)

#### IV.3.1.1. Test de synergie :

Les BLSE, dérivées des enzymes de classe A, (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de B-lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam). (K. Rahal et al 2014)

##### Principe :

Le disque contenant de la céfotaxime (CTX) ou céftriaxone (CRO) et celui contenant l'amoxicilline / acide clavulanique (AMC) sont placés à une distance de 30 mm l'un de l'autre. La zone d'inhibition autour du disque de céfotaxime (ou céftriaxone) est augmentée en direction du disque d'acide clavulanique, ce qui indique une synergie (image de bouchon de champagne) entre la céfotaxime (ou céftriaxone) et l'acide clavulanique.



**Figure 14** : Souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamase à spectre élargi (Bouchon de champagne) (K. Rahal et al 2011)

#### IV.3.1.2. Test du double disque (test espagnol) :

Ce test devra être fait systématiquement devant :

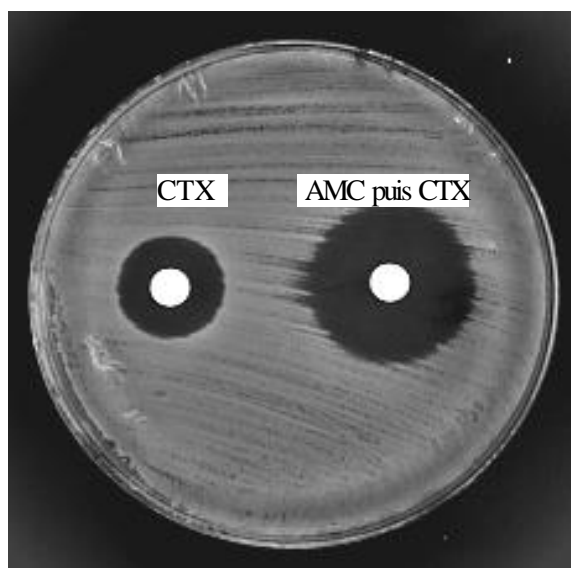
- \_ L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G
- \_ La présence d'une résistance (diamètre d'inhibition < 6mm) aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, cefazoline, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

(Rahal K et al 2014)



Principe :

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (**K. Rahal et al 2005**)



**Figure 15 :** Test du double disque positif : *K. pneumoniae* productrice de BLSE. (**K. Rahal et al 2011**)

**IV.3.1.3. Test à la Cloxacilline :**

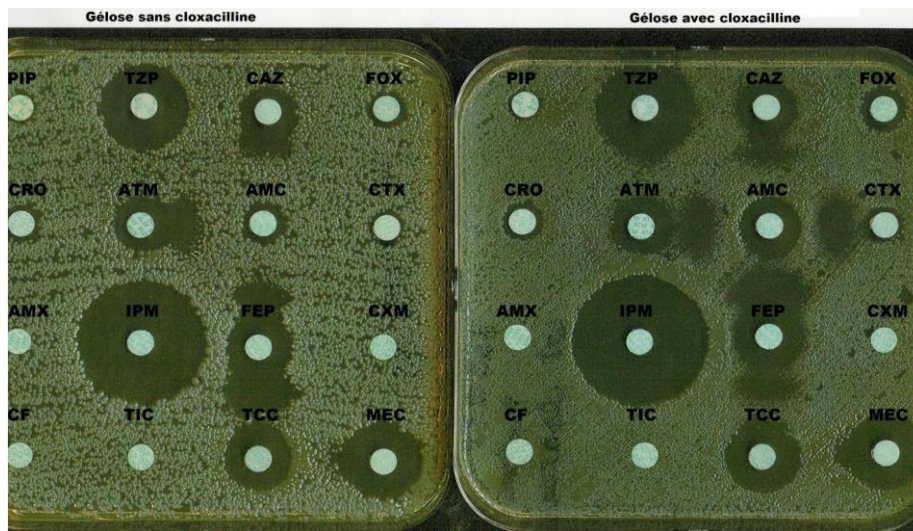
Pour certaines souches de bacilles à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hypersécrétions de Cases (CHN) des BLSE, Le test à la cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase dérégulée (ou hyperproduite). (**K. Rahal et al 2014**)

Principe

Ce test utilise la cloxacilline qui agit comme inhibiteur de Case tout en restant inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif

La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe in vitro toutes les céphalosporinases hyperproduites et reste inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif. (**L Drieux et al. 2008, A. Philippon et G. Arlet 2006**).

Si un tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité de  $\beta$ -lactamases et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée. Le test à la cloxacilline est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur MH additionné de cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline. (K. Rahal et al 2014)



**Figure 16 :** Antibiogramme d'une souche d'*E. cloacae* sur une gélose MH avec et sans Cloxacilline (L. Drieux et al. 2008)

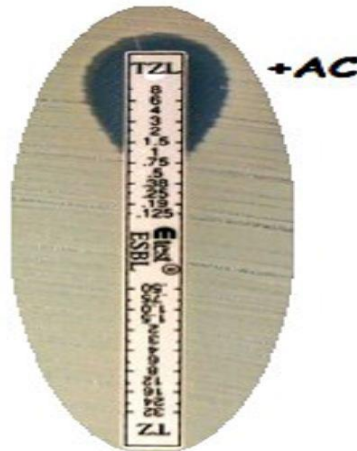
#### IV.3.1.4. E-test BLSE :

##### Principe :

Les E-test BLSE se présentent sous forme de double bandelette imprégnée d'un côté par un gradient de concentration d'une C3G et de l'autre côté par un gradient de concentration de la même C3G additionnée d'acide clavulanique à concentration constante (4mg/L).

Le test est considéré comme positif pour toute diminution d'au moins 3 dilutions de la CMI de la C3G en présence d'acide clavulanique par rapport à la CMI de la C3G seule.

L'interprétation des résultats de ce type de test est parfois délicate. (P. Nordman 2010)



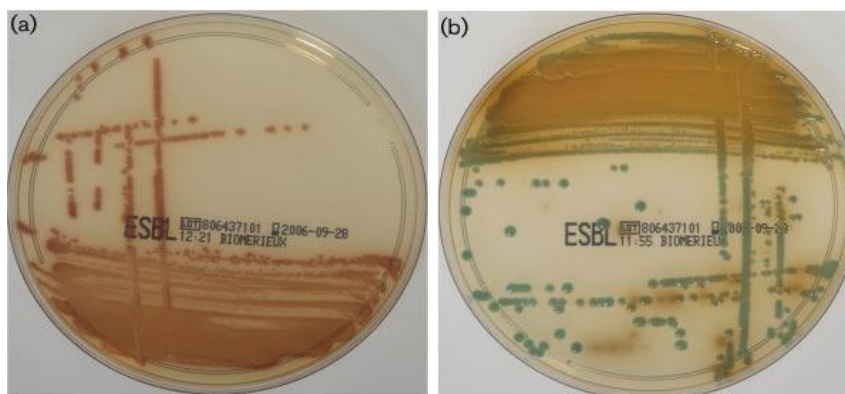
**Figure 17:** Détection de BLSE par l'E-test (P. Nordman 2010)

#### IV.3.1.5. Milieu chromogène de détection de BLSE (chromID ESBL)

Le chromID ESBL est un tout nouveau et innovant milieu chromogène spécialement conçu pour la détection des entérobactéries productrices de BLSE.

##### Principe

L'isolement et la détection est basé sur l'utilisation au sein du milieu d'antibiotiques, tel que le cefpodoxime qui est reconnu comme étant le marqueur de choix pour ce mécanisme de résistance. (Marcy l'Etoile France, C. CAZANAVE 2015)



**Figure 18:** Identification des entérobactéries BLSE par chromID ESBL (H. Réglier-Poupet et al 2008).

ChromID BLSEensemencé avec *E. coli* (a), et un mélange de *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* (b). Sur chromID BLSE, les colonies de *E. coli* apparaissent en rose / bordeaux, les colonies du groupe *Klebsiella / Enterobacter / Serratia* apparaissent en bleu / vert et les colonies de la tribu *Proteae* apparaissent de brun clair à brun foncé. (H. Réglier-Poupet et al 2008)

#### IV.3.1.6. Méthodes automatisées :

Des automates de bactériologie pour identification et antibiogramme sont de plus en plus utilisés (Mini-Api®, Phoenix®, Microscan, Vitek®, Vitek-2®, Vitek Compact®).

D'une manière générale, ils détectent bien les BLSE chez les souches qui n'hyperproduisent pas habituellement de céphalosporinases (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*).

Pour les autres espèces (*Enterobacter.spp*, *Citrobacter.spp*, *Serratia.spp*, etc.), leur sensibilité et surtout leur spécificité sont un peu moins bonnes que celles des méthodes manuelles. (C. ÉMILE 2008)

#### IV.3.2. Méthodes phénotypiques appliquées à la recherche de céphalosporinase hyperproduite :

Ce type de résistance a été identifié dans les années 90, il est suspecté lorsqu'il existe une résistance acquise aux C3G avec un test de synergie négatif.

Les Cases de type AmpC sont inhibées par divers inhibiteurs tels que la cloxacilline (activité inhibitrice étroite) ou « BRL 42715 » et « Ro 48-1220 » qui ont une activité inhibitrice plus large.

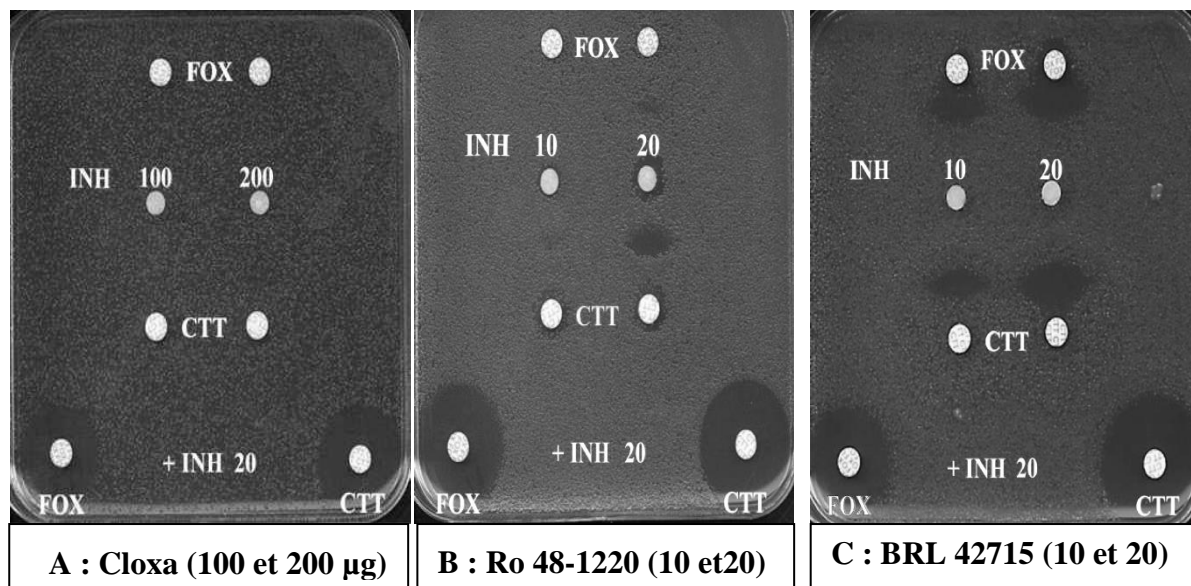
**BRL 42715** : N-1 methyl-1, 2,3-triazolyl méthylène inhibiteur des enzymes plasmidiques : TEM, SHV, OXA et les enzymes chromosomiques retrouvées chez *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Serratia spp*, *Morganella spp*, *Escherichia spp*, *Klebsiella spp* et *Proteus spp*.

**Ro 48- 1220** : 2 β alkenyl penicillamic acid sulfone inhibiteur des β- lactamases des groupes 1, 2b et 2be. (K. Rahal at al 2014)

##### IV.3.2.1. Méthode des 2 disques de céfoxitine et céfotétan avec inhibiteur:

Réaliser un antibiogramme, dans une boîte carrée de 16 cm, avec deux disques de céfoxitine (FOX) et deux disques de céfotétan (CTT).

Placer 2 disques vierges imprégnés d'une solution d'inhibiteur de Case (INH), et un disque de céfoxitine et un disque de céfotétan auxquels on ajoute une solution d'inhibiteur à la concentration de 20 µg (Ro 48- 1220 ou BRL 42715) (figure 19) (K. Rahal al 2014)



**Figure 19:** Recherche des Cases par la méthode des 2 disques de céfoxitine et céfotétan avec inhibiteur (K. Rahal al 2011)

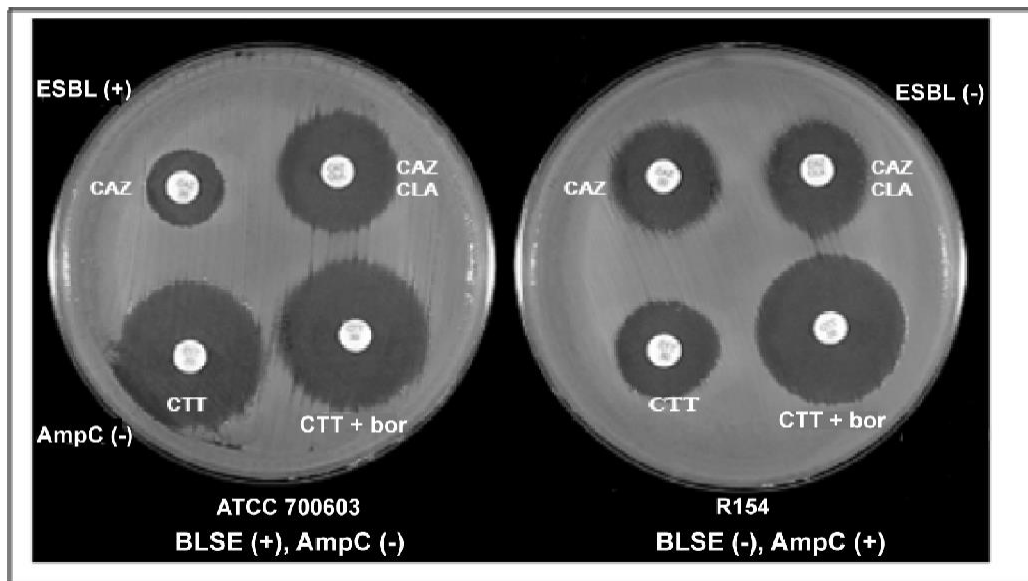
- Apparition d'une image de synergie entre les disques FOX et /ou CTT et le disque d'inhibiteurs.
- La cloxacilline est un faible inhibiteur par rapport aux autres inhibiteurs testés. (K. Rahal al 2014)

**IV.3.2.2. Test à la cloxacilline :** voir détection de BLSE par test à la cloxacilline

**IV.3.2.3. Test d'inhibition par l'acide boronique :**

Principe :

Un disque contenant le céfotétan et un autre disque contenant le céfotétan combiné avec l'acide boronique sont placés cote à côté dans une boîte MH ensemencée préalablement par la suspension bactérienne, l'acide boronique va inhiber les céphalosporinases et toute augmentation du diamètre d'inhibition de 5 mm, voire plus, autour du disque de céfotétan associé à l'acide boronique par rapport au disque de céfotétan seul révèle la présence d'AmpC. (K. Rahal al 2011)



**Figure 20** : Comparaison entre le test de confirmation pour les BLSE et le test à l'acide boronique pour la détection des AmpC. (K. Rahal al 2011)

**A gauche**: *K. pneumoniae* ATCC 700603 BLSE(+) AmpC(-).

En haut: L'acide clavulanique restaure l'activité de céftazidime ;

En bas: il n ya pas de différence significative entre les diamètres d'inhibition autour de céfotétan seul et céfotétan+acide boronique.

**A droite**: *K. pneumoniae* ATCC R154 BLSE(-) AmpC(+).

En haut: L'acide clavulanique ne restaure pas l'activité de ceftazidime ;

En bas: l'acide boronique restaure l'activité de céfotétan avec présence d'une image de synergie entre les deux zones d'inhibition.

Technique et lecture: voire annexe II.2

#### IV.3.2.4. Recherche à partir de l'extrait enzymatique

- Travailler à partir d'une culture fraîche de 18 H sur gélose Mueller-Hinton ; récupérer la culture dans un tube de centrifugation (10-15 mg) et resuspendre cette culture en eau peptonée, centrifugé à 3000 tr/mn pendant 15 mn.

- Extraction enzymatique :

Le culot de centrifugation va subir 7 étapes de congélation et décongélation entraînant la lyse bactérienne et libérant ainsi les enzymes.

- Ensemencer *E. coli* ATCC 25922 sur une boîte de MH, placer 4 disques de céfoxitine (30µg) au niveau des 4 extrémités d'une boîte ronde.

- Au centre de la gélose, à l'aide d'une pipette Pasteur, faire 4 petits puits distants de 5mm

entre eux.

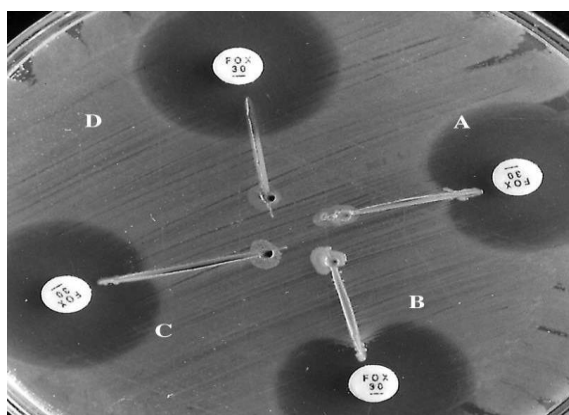
A partir de ces puits, découper à l'aide d'un scalpel stérile 4 petites lignes de gélose de 3 cm de long vers les 4 disques de céfoxitine. S'arrêter à 3 mm du disque.

- Déposer 30 à 40 µl d'extrait enzymatique dans les 4 puits.

- Laisser reposer 5 à 10 mn la boîte, incuber 1 nuit à 35 °C.

Ce test doit être refait sur une autre boîte après addition dans l'extrait enzymatique d'un disque de 5 µg de cloxacilline incubé à 35 °C pendant 30 mn.

Puis on dépose cet extrait dans la boîte. (K. Rahal al 2014)



La souche A (souche testée) : nette déformation de la zone d'inhibition.  
Souche B : souche de référence AmpC (+);  
Souche C (souche testée) : faible déformation du diamètre d'inhibition, elle est considérée comme indéterminé ou négatif;  
Souche D: souche de référence négative AmpC(-).

**Figure 21:** Recherche de céphalosporinase à partir de l'extrait enzymatique (K. Rahal al 2011)

### VI.3.3. Méthode phénotypiques appliquées à la recherche des entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) :

La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. En outre, dans certains cas, la sensibilité de détection de la production de carbapénémase peut être améliorée par l'utilisation d'au moins 2 carbapénèmes différentes (ex : imipénème ET ertapénème).

Il faut donc considérer comme suspecte d'EPC toute souche de SENSIBILITE DIMINUEE (I/R) à au moins l'un des carbapénèmes (L. DORTET et al 2018)

#### IV.3.3.1. Indications de la détection des EPC :

En pratique courante au sein des laboratoires de microbiologie, la détection des bactéries productrices de carbapénèmases s'appuie tout d'abord sur la détermination de la sensibilité des souches aux carbapénèmes quelle que soit la méthode utilisée (tableaux 8 et 9).

Puisque les valeurs de CMI de l'ertapénème sont généralement plus élevées que ceux des autres carbapénèmes. On doit suspecter la production d'une carbapénémase lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque d'ertapénème est < 28 mm (CASFM-2013) ou < 25 mm (CASFM 2015) ou que la CMI est  $\geq 0,5$  mg/L. **(CA-SFM et EUCAST 2017)**

**Tableau 8 :** Seuils des diamètres d'inhibition préconisés par les standards français, européen et américain pour l'interprétation de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux carbapénèmes **(CA-SFM et EUCAST 2017, K. Rahal et al 2014)**

Molécule	CA-SFM et EUCAST(2017)		CLSI (2014)	
	S $\geq$	R <	S $\geq$	R <
Doripénème(10ug)	24	21	-	-
Ertapénème(10ug)	25	22	21	18
Imipénème(10ug)	22	16	22	19
Méropénème(10ug)	22	16	22	19

**Tableau 9 :** Seuils de CMI préconisés par les standards français, européen et américain pour l'interprétation de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux carbapénèmes **(CA-SFM et EUCAST 2017, K. Rahal et al 2014)**

Molécule	CA-SFM et EUCAST(2017)		CLSI (2014)	
	S $\leq$	R >	S	R
Doripénème	1	2	1	4
Ertapénème	0.5	1	0.25	1
Imipénème	2	8	1	4
Méropénème	2	8	1	4

Les concentrations critiques des carbapénèmes ont été définies de sorte que les isolats cliniques producteurs de mécanismes de résistance importants sur le plan clinique incluant la majorité des carbapénémases chez les Enterobacteriaceae seront catégorisés «intermédiaires» ou «résistants» à ces molécules.

Toutefois, certains isolats d'entérobactéries producteurs de carbapénémases (EPC) sont catégorisés «sensibles» aux carbapénèmes et doivent être rapportés comme tel ; la présence d'une carbapénémase n'interfère pas sur la catégorisation de ces EPC. **(CA-SFM et EUCAST 2017)**

Il est donc important de rechercher la présence d'une carbapénémase devant non seulement toute souche classifiée comme intermédiaire ou résistante à l'un des carbapénèmes (et notamment à l'ertapénème, qui doit absolument être testé), mais aussi devant toute souche



possédant une légère diminution de sensibilité aux carbapénèmes par rapport à un phénotype sauvage. (L. Dortet et al 2013)

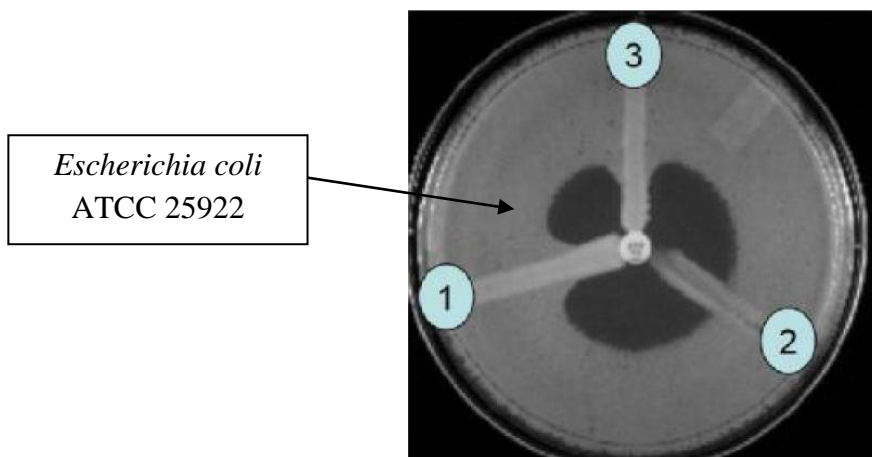
#### IV.3.3.2. Test de Hodge modifié :

Le test de Hodge modifié est la méthode actuellement recommandée par le CLSI comme méthode phénotypique générale de détection de la production de carbapénémases. (K. Rahal al 2014)

##### Principe :

Ce test est basé sur l'inactivation d'une carbapénème par une souche productrice de carbapénémases permettant à une souche contrôle (*E. coli* sensible à l'antibiotique) de prolonger sa croissance vers le disque contenant l'antibiotique (ertapénème), au long de la strie de l'inoculum de la souche testée (N. Grall et al 2011)

Ce test permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre souches productrices de carbapénémases (souches à tester) et souches sauvages de référence sensible. (L. DORTET et al 2018)



**Figure 22 :** Test de Hodge modifié. (Rahal K et al 2011)

- 1 : *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705(témoin positif)
- 2 : *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (témoin négatif)
- 3 : Souche testée

##### Avantage :

- Peu coûteux
- Bonne détection des souches productrices de carbapénémases de type OXA-48 et KPC

##### Inconvénients :

- Faux négatifs : essentiellement souches produisant une carbapénémase de type NDM.

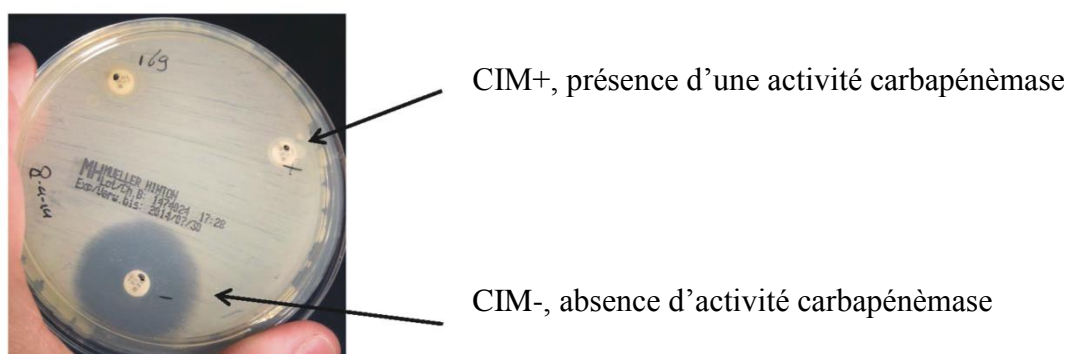
- Nombreux faux positifs : essentiellement *Enterobacter* spp surexprimant leur céphalosporinase naturelle.
- Nécessite un délai de 24 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec une identification rapide des carbapénèmases (**L. DORTET et al 2018**)

#### IV.3.3.3. CIM (Carbapenem Inactivation Method):

##### Principe :

Le principe de ce test repose sur l'hydrolyse du méropénème contenu dans un disque chargé à 10 µg. Après mise en contact pendant 2h avec la souche à tester, le disque est testé sur une souche *d'E. coli* sensible ATCC 29522.

Si la souche produit une carbapénémase, le méropénème est hydrolysé et la souche *d'E. coli* ATCC pousse au contact du disque. A l'inverse, si la souche ne produit pas de carbapénémase, le méropénème reste actif et une zone d'inhibition est visible (**K. van der Zwaluw et al 2015**)



**Figure 23 : test de CIM (L. DORTET et al 2018)**

##### Avantages

- Peu coûteux
- Simplicité de mise en place (nécessite peu de moyens : matériels et réactifs) et d'interprétation (présence/absence d'une zone d'inhibition)
- Sensible et spécifique

##### Inconvénients

- Nécessite un délai additionnel de 24h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec une identification rapide des carbapénèmases (**L. DORTET et al 2018**).

#### IV.3.3.4. Tests d'inhibition :

Ces tests sont basés sur l'inhibition de l'activité des différentes carbapénèmases par des molécules ayant des propriétés inhibitrices telles que :

l'acide boronique vis-à-vis des carbapénèmes de type KPC, l'acide dipicolinique ou de l'EDTA vis-à-vis des métallob-lactamases. (L. DORTET et al 2018)

**Tableau 10** : les inhibiteurs de chaque type carbapénémase (originale)

Molécule	Carbapénémase inhibée
Acide boronique	KPC
EDTA ou Acide dipicolinique	Métallo-bétalactamase

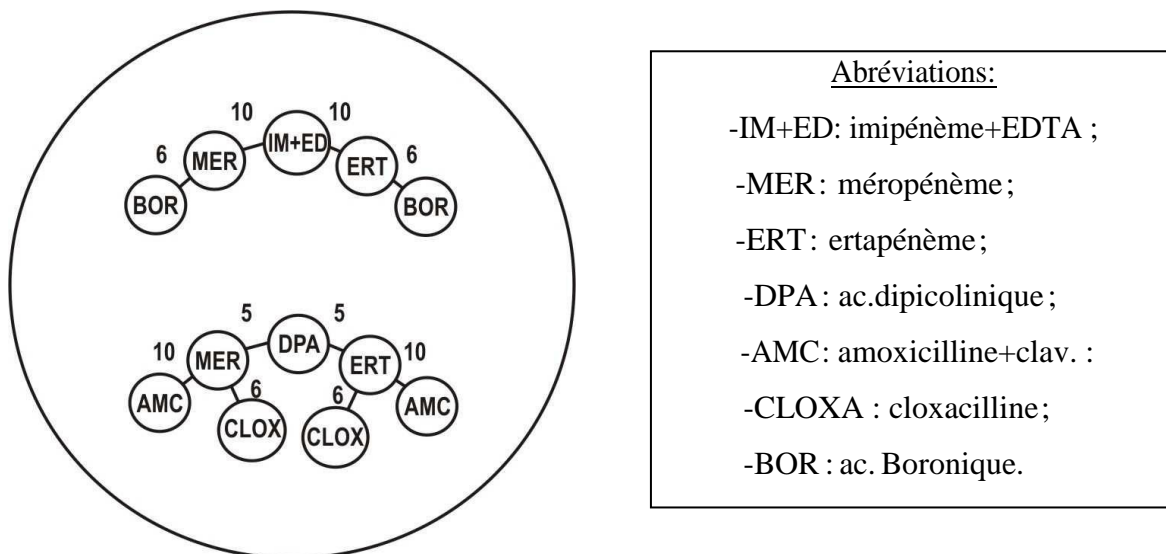
Ou l'inhibition de la témocilline par les carbapénèmes de type OXA-48.

**IV.3.3.4.1. Méthodes des disques combinés :**

Principe :

Des disques utilisant le méropénème combiné à différents inhibiteurs de β-lactamases (méropénème couplé à l'EDTA : inhibiteur des enzymes de classe B, méropénème couplé à l'acide aminophénylboronique ABPA : inhibiteur des enzymes de classe A et du méropénème couplé à la cloxacilline :inhibiteur des céphalosporinases hyperproduites) permettent la détection et l'identification du mécanisme à l'origine de la résistance aux carbapénèmes ; de faire la distinction entre la production de carbapénèmes et la présence d'une céphalosporinase de haut niveau ou de BLSE couplée à une modification des porines. (J-P. Kleina et T. Gorsy 2014);

Une différence ≥ 5 mm entre le disque combiné et le disque chargé uniquement avec le méropénème est considérée comme positif. (C. Bertholom 2013)



**Figure 24** : Schéma proposé par Rosco illustre la disposition des disques et les distances entre eux pour la détection des carbapénèmes KPC, métallob-lactamases et oxacillines (K. Rahal al 2011)

Cependant les méthodes des disques combinés présentent les inconvénients suivants :

- Quelques faux positifs : essentiellement *Enterobacter* spp. surexprimant leur céphalosporinase naturelle qui peut être inhibée par l'acide boronique
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC possédant un bas niveau de résistance au mérépénème
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC produisant plusieurs carbapénèmases de différent types (ex : NDM + OXA-48-like, KPC + VIM)
- Nécessite un délai additionnel de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec l'identification rapide de carbapénèmases (**L. DORTET et al 2018**)

#### **IV.3.3.4.2. E-Test (inhibition par EDTA)**

##### Principe :

Les bandelettes E-test permettent la détection des métallo- $\beta$ -lactamases en combinant l'imipénème et l'EDTA. D'autres bandelettes existent combinant le mérépénème et l'EDTA ou l'acide boronique. (**J P. Kleina et T. Gorsy 2014**);

#### **IV.3.3.4.3. Inhibition par la témocilline :**

-Afin de pouvoir détecter également les carbapénèmases de type OXA-48, un disque contenant de la témocilline est présent dans certains kits commerciaux. En effet, la grande majorité des souches produisant une carbapénémase de type OXA-48 (98.2%) sont très résistantes à la témocilline (diamètre d'inhibition inférieur à 12 mm pour des disques chargé à 30  $\mu$ g). La résistance à la témocilline possède une bonne valeur prédictive positive pour les EPC de type OXA-48 (**L. DORTET et al 2018**)

#### **IV.3.3.5. Tests biochimiques :**

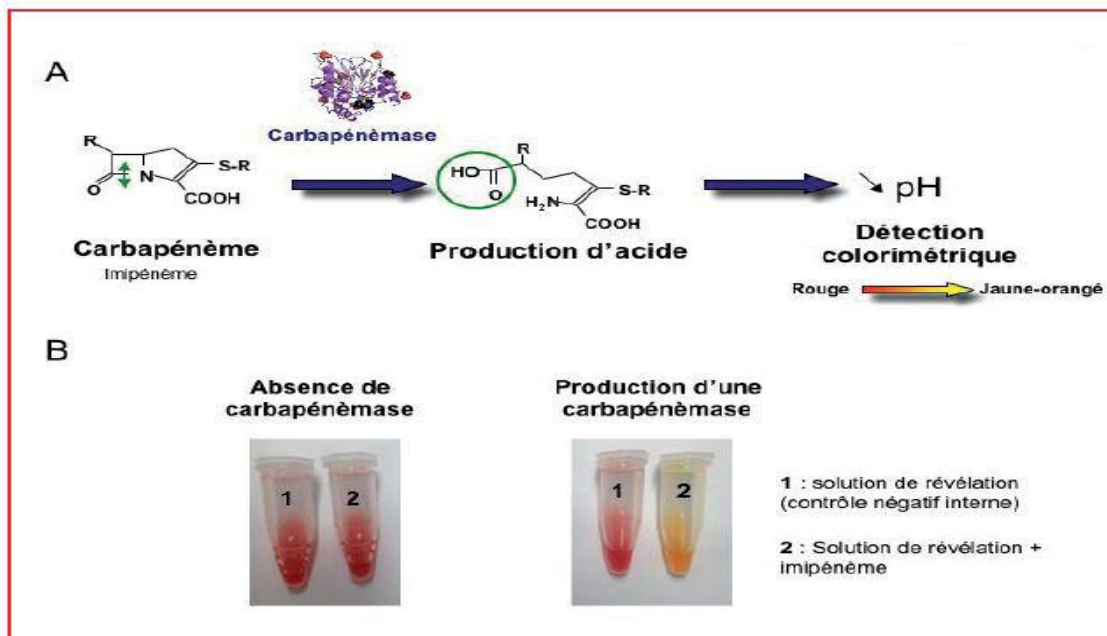
##### **IV.3.3.5.1. Carba NP test :**

C'est une technique biochimique colorimétrique de diagnostic rapide d'une activité carbapénémase.

##### Principe :

Son principe repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase (figure 25).

L'indicateur de pH (Rouge de phénol) change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase. (L. DORTET et al 2018, L. Poirel et al 2013, CarbaNP test 2018)



**Figure 25 :** Principe du test de diagnostic rapide, Carba NP test. (L. Dortet et al 2013)

Il présente les avantages et les inconvénients suivants :

Avantages :

- Peu coûteux,
- Peut être réalisé sur les souches isolées,
- Facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire,
- Rapide (< 2h) sur souches isolées
- Bonne sensibilité (90 à 100% selon les études) et excellente (100%) spécificité de détection de TOUTES les carbapénémases.

Inconvénients :

- Certaines études indiquent des difficultés de lecture (virage de couleur difficile à lire) pour certaines carbapénémases dont l'activité catalytique est plus faible que les autres (certaines souches OXA-48-like notamment) (L. DORTET et al 2018).

**IV.3.3.5.2. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight).**

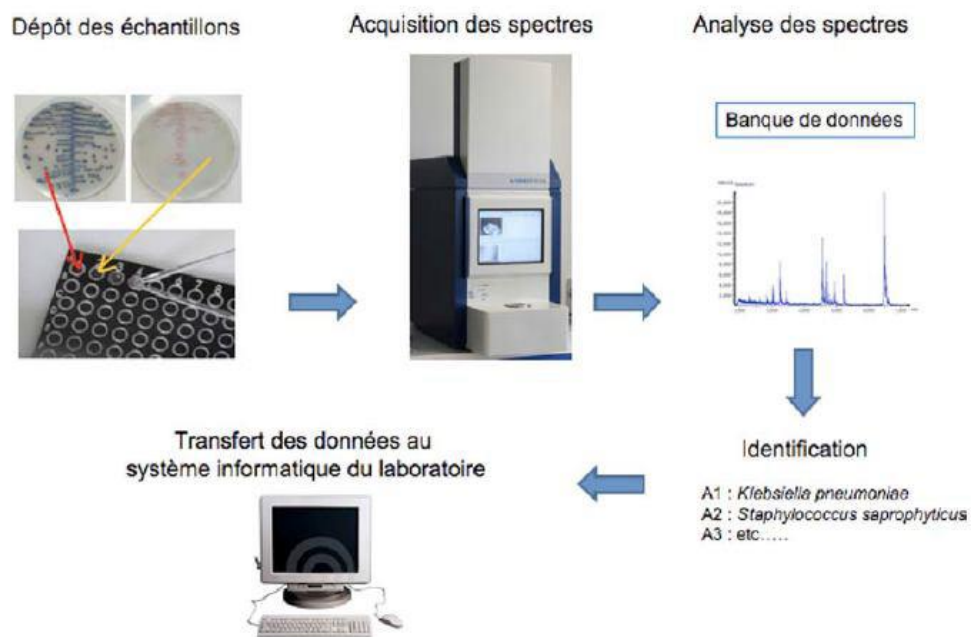
C'est une technique de détection d'une activité carbapénémase correspond à la recherche d'une modification du spectre d'un carbapénème sous l'effet d'une carbapénémase.

Il s'agit d'une application de la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF). (L. DORTET et al 2018)

Principe :

Cette technique est basée sur la détection par spectrométrie de masse, après mise en contact pendant quelques heures (en général 2-3h) de la souche à tester avec une solution de carbapénèmes, de la disparition du pic correspondant au carbapénèmes testé et de l'apparition d'un pic correspondant au(x) produit(s) d'hydrolyse de ce même carbapénèmes.

(C. Mirande et al 2015)



**Figure 26 :** Les principales étapes de l'identification par MALDI-TOF à partir de colonies.

(A. Gravet et M. Gessier 2013)

Avantage :

- Rapide (< 1h) sur souches isolées
- Bonne sensibilité et spécificité
- Identification concomitante de la bactérie possible avec le système commercial

Inconvénients :

- Nécessité de posséder un automate MALDI-TOF (L. DORTET et al 2018)

#### IV.3.3.6. Spectrométrie UV

Il est également possible de détecter la production de carbapénèmes par l'utilisation de la spectrophotométrie UV, Une pré-culture de la bactérie à tester doit être réalisée, puis l'extrait enzymatique est récupéré après sonication du culot bactérien, ensuite il est testé en présence du substrat de carbapénème.

En cas d'hydrolyse, la diminution d'absorbance observée traduira une hydrolyse du substrat et donc la présence d'une carbapénémase. Cette technique est très sensible et très spécifique, mais nécessite un personnel qualifié. (L. Poire et al 2013)

#### IV.3.3.7. Milieux de dépistage spécifiques

Ces dernières années, des milieux sélectifs ont été développés pour la détection des EPC.

Parmi ces milieux, on distingue essentiellement :

##### ♦ ChromID® Carba (bioMérieux) et Brilliance® CRE (Oxoid)

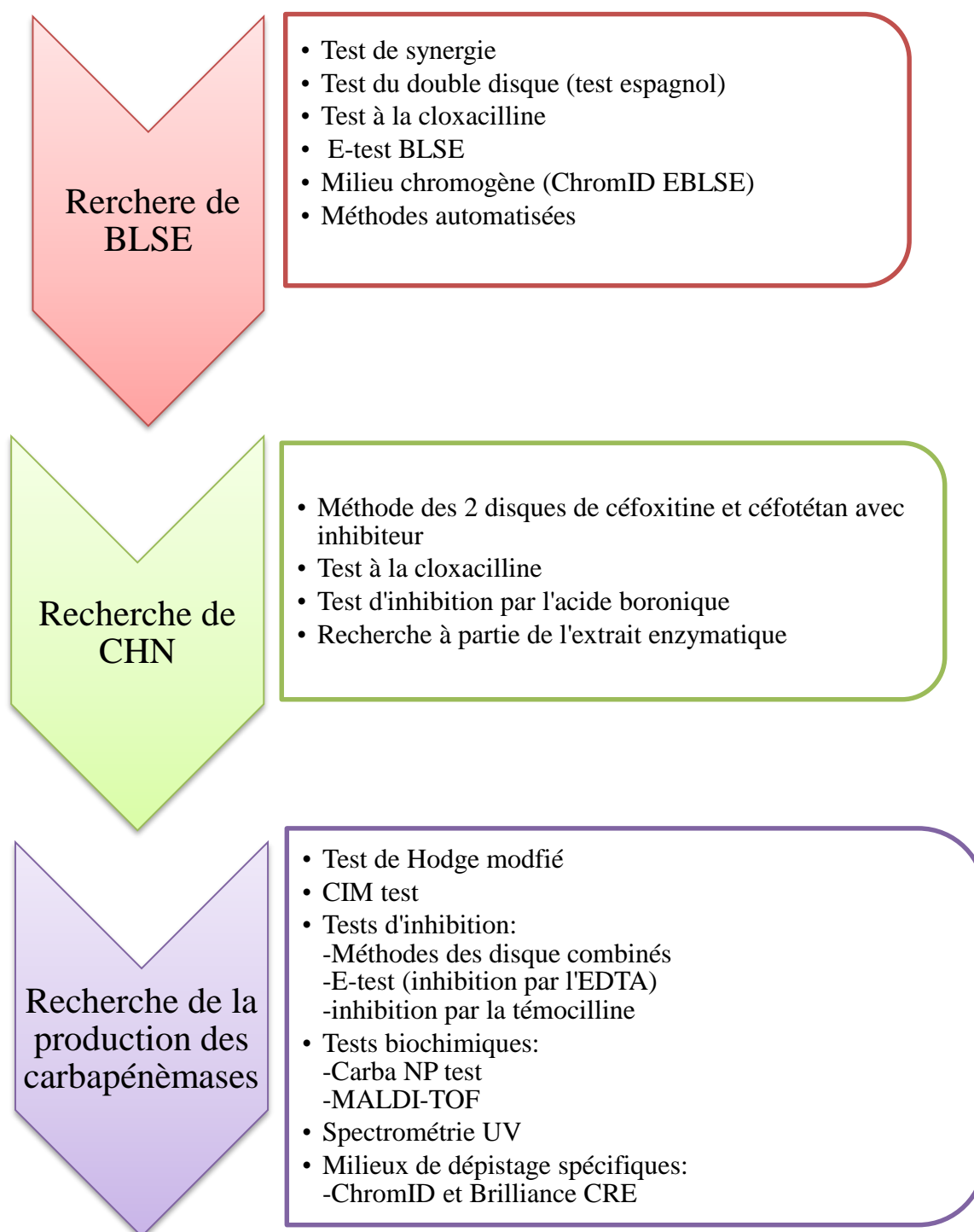
Ces deux milieux contiennent une carbapénème et des chromogènes facilitant l'identification rapide des espèces bactériennes d'entérobactéries. Les études réalisées avec ces deux milieux ont montré de bonnes sensibilité et spécificités pour la détection des EPC, hormis pour certaines souches productrices d'OXA-48. (L. DORTET et al 2018)



Figure 27: ChromID® (bioMérieux)



figure 28: Carba Brilliance® CRE (OXOID) (L. DORTET et al 2018)



**Figure 29** : Schéma globale des différentes méthodes phénotypiques pour la recherche de BLSE, CHN et Carbapénèmases (**originale**)



# **CHAPITRE V : SITUATION EPIDEMIOLOGIE**

---

**La situation épidémiologique de l'antibiorésistance chez les entérobactéries**

## Chapitre V : Situation Epidémiologique:

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. ou le tube digestif est le principale réservoir de celle-ci (**D.Lepelletier et all 2015**).

### V.1 Situation épidémiologique des entérobactéries résistantes aux C3G :

#### V.1.1 Dans le monde :

Les bêtalactamase à spectre élargi (BLSE), découvertes initialement chez les souches de *K. pneumoniae* en Allemagne en 1983 puis en France, puis en Tunisie, ce sont des enzymes de classe A plasmidiques qui présentent un fort potentiel de diffusion à travers le monde . (**CClin 2017**)

les données de surveillance de l'antibiorésistance publiées par l'OMS mettent en évidence Les bactéries résistantes les plus souvent signalées sont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, suivies de *Salmonella spp* (**OMS 2018**)

#### V.1.2 En Amérique :

Dans un rapport de 2013 du CDC, on faisait état de 140 000 infections nosocomiales dues à des entérobactéries desquelles 19 %, BLSE + (**CDC, 2013**)

#### V.1.3 En Europe :

**En France** :La résistance aux céphalosporines de 3e génération (C3G) chez *E.coli* a régulièrement augmenté de 2,0 % en 2006 à 11,2 % en 2016 parmi les souches isolées d'infections graves , le mécanisme de résistance aux C3G le plus fréquent (80 % des cas) est la production de bêtalactamase à spectre étendu (BLSE). L'incidence des entérobactéries à BLSE a augmenté de 17 cas de EBLSE pour 100 000 journées d'hospitalisation en 2006 contre 71 cas en 2016 (**EARS-Net BMR-Raisin via France 2017**)

#### V.1.4 Au Maghreb :

On cite le cas du Maroc Au niveau de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech, durant l'année 2015 et 2016. Les principaux résultats obtenus étaient : Sur les 9042 prélèvements bactériologiques analysés, 1356 prélèvements bactériologiques étaient positifs dont 215 prélèvements concernaient les BMR, soit une prévalence globale de 16%.

Les Entérobactéries BLSE étaient les BMR les plus fréquemment isolées (65,11%),(Amhal.Z 2017 )

### V.1.5 En Algérie :

La résistance aux bêtalactamines chez les entérobactéries en Algérie est dominée par la production de BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-15. Les souches productrices de ces enzymes sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères aussi bien en milieu hospitalier que communautaire. Les céphalosporinases plasmidiques identifiées sont CMY-2, CMY-12 et DHA-1 (Baba Ahmed-Kazi Tani.Z et Arlet.G 2014)

Selon le 17<sup>ème</sup> rapport de réseau de surveillance algérien les EBLSE chez les patients hospitalisés pendant l'année 2016 était 4307 isolats équivalents à plus que la moitié de total des souches isolées (56,37%)

## V.2 Situation épidémiologique des entérobactéries productrice de carbapénèmase :

### V.2.1 Dans le monde :

#### V.2.1.1 Les EPC de classe A :

Depuis les années 1980, les carbapénémases de classe A ont été identifiées de façon sporadique. rapportées par la plupart des isolats de *K. pneumoniae* nosocomiales et une moindre mesure, par d'autres espèces d'entérobactéries. la mortalité attribuée aux infections dues à des souches productrices de KPC est élevée (supérieure à 50 %) qui est la plus inquiétante des carbapénémases, de par sa grande résistance clinique aux carbapénèmes. A l'heure actuelle, 19 variants ont été identifiés. Les pays les plus touchés sont les USA, Israël, la Grèce et l'Italie. (Choquet.M 2016)

#### V.2.1.2 Les EPC de classe B :

La NDM ayant le plus d'impact clinique est la NDM-1, identifiée la première fois en 2009 en Suède chez un patient de retour d'Inde. En effet, la partie du monde la plus affectée par cette enzyme est le sous-continent Indien avec un portage dans la population estimée de 5 à 15% 2015 (Awa Ndir 2015)

Les autres métallobêta-lactamases (VIM et IMP) Les enzymes de type VIM, initialement décrites au sein de souches de *Pseudomonas* spp. ont été transférées aux entérobactéries et ont surtout été rapportées au pourtour du bassin méditerranéen (Italie et Grèce) où elles

sont fréquemment rencontrées chez des patients hospitalisés aux soins intensifs (Holman.A 2016).

### V.2.1.3 Les EPC de classe D : OXA-48

La première souche de productrice d'OXA-48 a été isolée en Turquie en 2003, ensuite elle été très largement retrouvée dans tous les pays du pourtour méditerranéen et en Afrique. Il y a une tendance à la hausse de l'identification des OXA-48 producteurs dans des pays tels que la France, l'Allemagne, l'Espagne, les Pays-Bas et au Royaume-Uni grâce au transfert de patients hospitalisés entre zones d'endémie. (Choquet.M 2016).

### V.2.2 En Amérique :

Les enzymes KPC demeurent le type de carbapénémase le plus prévalent de nos jours aux États-Unis et parmi les 50 États américains, 48 ont rapporté au moins un cas de patient colonisé ou infecté avec une entérobactérie productrice de KPC. (CDC, 2015).

Une revue des neuf premières souches de NDM-1 rapportées aux États-Unis a été publiée; la plupart des patients chez qui une telle souche a été isolée avaient une histoire d'hospitalisation récente en Inde ou au Pakistan (WSDH 2016)

### V.2.3 En Europe :

En France, les premiers signalements impliquant une EPC remontent à 2004 et leur multiplication à 2009. Au 31 décembre 2016, 3 319 signalements impliquant une EPC ont été adressés à Santé publique France (données non publiées), dont 1 062 en 2016 (soit 45,5 % des signalements reçus en 2016). Trois quarts des signalements concernent des colonisations. La proportion de cas secondaires reste légèrement supérieure à 20 % : 21 % en 2015 et 23,5 % en 2016. une surveillance spécifique mise en place afin de suivre l'émergence de ces BHRa a montré une très nette augmentation des épisodes à EPC depuis 2012 à 2015, 2385 épisodes à EPC ont été signalés. L'espèce bactérienne la plus fréquemment retrouvée reste *Klebsiella pneumoniae*, et le mécanisme de résistance est principalement de type OXA-48, sur la période 2012-2015 (Signalement des IAS via eSIN / Santé publique France 2017)

**En Suisse** : En 2014, la première éclosion a été observé et documentée de KPC, concernant trois patients hospitalisés à St.Gall.9 Depuis 2 ans ; le centre de surveillance de l'antibiorésistance en Suisse a rapporté une augmentation inquiétante de souches d'*E.coli* et *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (151 souches d'*E.coli* en 2015 contre 61 en 2012, et 216 souches de *K. pneumoniae* en 2014 contre 110 en 2012). Pour environ un tiers de ces bactéries multirésistantes la présence d'une carbapénémase a été confirmée par test moléculaire (**F.Olearo et al 2017**)

Dans certains pays du sud de l'Europe, la proportion de résistance dépasse les 30 %.  
(**EARS-Net brochure 2017**)

#### **V.2.4 Au Maghreb :**

Au Maroc, une étude a été menée au CHU Hassan II de Fès ; ayant comme objectif l'étude sur l'état des lieux concernant les entérobactéries productrices de carbapénémases et leur émergence. Sur 95 souches d'entérobactéries isolées, 4 souches carbapénémases OXA-48 ont été détectés

Dans une étude tunisienne incluant uniquement les hémocultures une prévalence élevée des BMR touchant (15,3%) pendant l'année 2015 et 2016

#### **V.2.5 En Algérie**

En Algérie, OXA-58 a été décrite pour la première fois en 2010 à Tlemcen. Depuis, plusieurs études ont rapporté la présence de ces gènes OXA-24, OXA-58 et OXA-72 dans le nord du pays OXA-23 est la carbapénémase la plus répandue et semble être endémique en Algérie (**L.Dortel 2016**)

Selon le 17<sup>ème</sup> rapport d'évaluation 2016 de réseau de surveillance algérien les EPC chez les patients hospitalisés sont de nombre 95/4574 isolats d'entérobactéries elles représentent par ailleurs 4.09% des BMR.

### **V.3 Etude épidémiologique des entérobactéries résistantes à la colistine :**

#### **V.3.1 Dans le monde :**

Avant novembre 2015 : (Resistance chromosomique) il a été noté une augmentation des *K. pneumoniae* résistante à la colistine **en Grèce** de 3.5% en 2008 => 20.8% en 2010 et **en Italie** de 22.4% en 2011 => 43% en 2013–2014 **Espagne** : 13.2% en 2010 => 31.70% (**Bonnet .R 2018**)

En 18 novembre 2015, la résistance acquise à la colistine médiée par le plasmide mcr-1 a été détecté pour la première fois en Chine. Les souches isolées chez l'homme représentent 13,5 % dont la moitié a été isolée en Asie (75 en Chine, 1 au Cambodge, 1 en Inde, 6 au Laos, 2 en Malaisie, 14 à Taiwan et 1 au Vietnam) (**Dortet.L et all 2016**)

Un second gène de résistance à la colistine a été mis en évidence en Belgique. mcr-2 est hébergés sur un plasmide présent chez des *Escherichia coli* chez des porcs et des bovins. Sa prévalence est légèrement supérieure à celle du mcr-1 (**Caniaux.I et all 2016**) (**Gay.E and al 2017**) Plus récemment encore (juin et juillet 2017), les gènes mcr-3 et mcr-4 ont été identifiés, (**anses 2017**).

### V.3.2 En Europe :

**En France :** 19 cas de colonisations ou infections à entérobactéries porteuses du gène mcr-1 de résistance plasmidique à la colistine ont été signalés à Santé publique France et au Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques depuis 2016. Parmi eux, 4 souches étaient également productrices de carbapénémase (EPC) (**CONGRÈS SF2H - 8 JUIN 2017**), et identifiées chez des patients ayant un antécédent d'hospitalisation à l'étranger (Côte d'Ivoire, Portugal, Maroc et île Maurice. Un cas de transmission secondaire d'une entérobactérie mcr-1 (non EPC) a été identifi dans un établissement de santé français (**Le HCSP 2017**).

**En Belgique :** période 2014-2017 dans 5 laboratoires belges ont trouvé des isolats d'Enterobacteriaceae porteur des plasmides mcr-1 de *E. coli* et *Salmonella enterica* La prévalence de ces souches mcr-1 positives reste faible. L'article princeps rapporte ainsi une prévalence de 1,4 % (13/902) et de 0,7 % (3/420) parmi les souches clinique de *E. coli* et *K. pneumoniae*, respectivement ( **Enquête ISSP Belgique 2017**)

**Une étude italienne** rapporte une prévalence de 6,5% (217/3294 dont *Salmonella*) issu de prélèvement clinique durant 2012-2015 et la prévalence d'entérobactéries résistance a médiation plasmidique mcr-1 est de l'ordre 4,6% (10/217) avec prédominance de *Salmonella* (**Bonnet .R 2018**).

### V.3.3 En Amérique :

Au Etat Unis on noter une prévalence de 11 % des souches d'entérobactéries résistante à la colistine (naturelle et/ou acquise) **au Brésil** parmi les 4620 souches testées (isolées entre 2000 et 2016). Parmi ces souches, 16 (soit 0,3 %) possédaient une résistance plasmidique

à la colistine de type mcr-1 **En Argentine**, la surveillance nationale de la résistance aux antibiotiques conduite par le WHONET-Argentina Network regroupant 90 laboratoires fait état d'une augmentation significative de la résistance à la colistine chez *E. coli* passant de 0,4 % en 2012 à 0,8 % en 2014 (**Pak Leung HO and Tak Chin 2017**)

#### **V.3.4 Au Maghreb :**

Une étude tunisienne réalisée de façon rétrospective sur des souches isolées entre 2005 et 2010 dans la région de Sfax à permis d'identifier des prévalences de résistance à la colistine de 0 %, 1,2 % et 1,5 % pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, respectivement(**Dortet.L et all 2016**)

#### **V.3.5 En Algérie :**

le 28 novembre 2016 le réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques a signalé la découverte récente de l'existence de souches d'*E. coli* productrices de mcr-1 en Algérie. Il s'agit de : 2 souches vétérinaires d'origine aviaire isolées en 2015 chez la volaille (origine Skikda). 2 souches humaines isolées en 2011, appartenant au même clone ST-405, isolées dans l'Oranais : la première à partir d'urines d'un patient polytraumatisé hospitalisé à l'hôpital de Sidi Belabbes. La seconde à partir d'une spermoculture d'un patient suivi au CHU d'Oran pour infertilité.(**derrière mise a jour 09-05-2018**).

# **CHAPITRE VI : TRAITEMENT ET PREVENTION**

---

**Les approches thérapeutiques et prévention**



## Chapitre VI : traitement et prévention

### VI.1 Traitement :

Sera traité ci après les approches thérapeutiques préconisées pour les infections causées par les entérobactéries selon l'étude de l'antibiorésistance et du mécanisme impliqué :

#### VI.1.1 Approches thérapeutiques des infections causées par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération :

La résistance aux céphalosporines de 3ème génération est généralement due à une production de BLSE et/ou céphalosporinase hyperproduite, ces bactéries restant sensibles à certaines molécules de la famille de bêtalactamines à savoir, les carbapénèmes et les céphalosporine 4ème génération ainsi que les associations incluant un inhibiteur de b-lactamase qui ont une action sur les BLSE. **(Choquet.M 2016)**

Même si les carbapénèmes semblent être les molécules de choix il conviendra de les préserver et d'éviter l'émergence de la résistance à ces molécules **(CAZANAVE .C 2016)**

Privilégier l'usage d'autres antibiotiques telle que les céphamycines, céfipime pivmecillinam, la témocilline, les associations  $\beta$ -lactamine-inhibiteur  $\beta$ -lactamases (BL-IBL) : piperaciline et tazobactam, céftolozane et tazobactam, ceftazidime et avibactam **(E. Baux-Pomarès 2015)**

##### VI.1.1.1 Céphamycines (Mefoxin®) :

La céphamycines est une sous famille des céphalosporines proche des C2G tel que la Céfoxitine (Mefoxin®), qui inhibe l'action des BLSE les souches peuvent les devenir résistantes au céphamycines en cours de traitement, donc il est recommandée d'associer avec la céfépime. **(HENARD S Et AISSA.N 2016)**

##### VI.1.1.2 Céfépime (AXEPIM®) :

Le céfépime est une céphalosporine de 4ième génération bactéricide ;contrairement aux céphalosporines de 3ième génération, le céfépime est actif contre les entérobactéries du groupe 3 « sauvages et celle ayant déréprimée leur céphalosporinase naturelle. **(CA-SFM/EUCAST 2015) (vaud et all 2018)**

### **VI.1.1.3 Piperacilline + tazobactam (TAZOCILLINE®)**

La pipéracilline est une pénicilline, du type uréidopénicilline,

Le tazobactam est un inhibiteur de betalactamase il n'a pas une activité antibactérienne, c'est un dérivé de l'acide pénicillinique, qui étend le spectre d'activité de la pipéracilline en inhibant les BLSE , (**Haute Autorité de Santé TAZOCILLINE 2016** )

### **VI.1.1.4 Ceftolozane + tazobactam (ZERBAXA®) :**

Le ceftolozane est une nouvelle céphalosporine de « 3ème génération » qui a une vitesse de bactéricidie meilleure lorsqu'il on associe au tazobactam

il s'agit contre les E-BLSE Classe A : TEM, SHV, CTX-M Classe D : OXA-BLSE (**L'avis de la Commission de la Transparence ZERBAXA 2016**)

### **VI.1.1.5 Ceftazidime + avibactam ( ZAVICEFTA®) :**

Est une association de ceftazidime (céphalosporine de 3ème génération) et L'avibactam un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamase non  $\beta$ -lactamine , qui est de la classe des diazabicyclooctanones, et qui possède une activité inhibitrice plus large que les inhibiteurs de bétalactamase disponibles actuellement et largement utilisée dans le traitement des infections nosocomiales sévères dues à des bactéries à Gram négatif (**LOIEZ. C 2017**)

Il inhibe les BLSE des classes Ambler A et C et certaines enzymes de classe D, les carbapénémases KPC et OXA-48 et les enzymes AmpC(cephalosporinase hyperproduite). L'avibactam n'inhibe pas les enzymes de classe B (métallo- $\beta$ -lactamases) et n'est pas capable d'inhiber de nombreuses enzymes de classe D. (**Lavigne J et.Pantel A 2016**)

son usage est approprié dans le cadre d'une stratégie d'épargne des carbapénèmes.(**avis de commission de transparence HAS 2016 ZAFICEFTA**) .

### **VI.1.1.6 Pivmécillinam (Selexid®) :**

Le Pivmécillinam est un dérivé des groupes des amidino-pénicillines agissant par inhibition de la paroi bactérienne par fixation sélective sur l'enzyme PBP2 des entérobactéries (**MAMOD .A 2016**) y compris certaines souches productrices de

bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) (**avis de commission de transparence SELEXID 2013**) (**CA-SFM/EUCAST 2015**).

#### **VI.1.1.7 Témocilline (Négaban®) :**

La témocilline est une pénicilline dérivée de la ticarcilline carboxy-pénicilline qui conserve une grande Stabilité par rapport à la plupart des bêtalactamase, incluant les BLSE et les HPCase(*AmpC*) et a des degrés variables sur les KPC. ,(R.Gauzit 2014) c'est un médicament orphelin (Soubirou. JF 2013) (MAMOD .A 2016).

#### **VI.1.2 Approches thérapeutiques des infections causées par les entérobactéries productrices de carbapénémases :**

La plupart des souches d'entérobactéries produisant une carbapénémase ont un phénotype de multirésistance aux antibiotiques qui limite très fortement les possibilités thérapeutiques cette multirésistance est en partie due à l'association fréquente de carbapénémases et de BLSE , les carbapénèmes , la colistine, les associations : colistine et tigécycline , carbapénème et tigécycline, fosfomycine et colistine ainsi aminoglycoside + fosfomycine+ carbapénème :

##### **VI.1.2.1 Les carbapénèmes :**

Comme la nature et le taux d'expression des carbapénémases ainsi que la coexistence d'autres mécanismes de résistance sont très variables d'une souche à l'autre, les CMI des carbapénèmes vis-à-vis des EPC sont très variables allant de 0,12 à >256 mg/L en effet certaines souches d'EPC pouvant être sensibles aux carbapénèmes et pour lesquelles ces antibiotiques sont potentiellement utilisables ainsi , seule la CMI semble conditionner l'utilisation de ces molécules .

il a été prouvé dans une étude sur la monothérapie par les carbapénèmes que la proportion d'échecs cliniques était significativement plus faible en cas de CMI  $\leq 8$  mg/L (28,6 %) par rapport à une CMI  $> 8$  mg/L (75,0 %) de façon intéressante, il n'y avait pas de différence du taux d'échecs cliniques entre les souches avec des CMI comprises entre 1 et 8 mg/L (25,0 à 33,3 %) alors que les concentrations critiques de sensibilité recommandées par l'EUCAST sont beaucoup plus basses (Cattoir.V 2014) en effet, la

durée de perfusion doit être prolongée à plusieurs heures pour atteindre les propriétés pharmacodynamiques optimales (**Vaud et all 2018**)

Une autre possibilité de l'utilisation des carbapénèmes est l'association entre doripénème méropénème et ertapénème, ce dernier jouant le rôle de « substrat suicide », l'ertapénème ayant une affinité plus importante pour les carbapénémases bloque l'enzyme, laissant ainsi l'autre carbapénème agir, l'efficacité de cette association a été démontrée in vitro en modèle chémostat et in vivo en modèle murin d'infection de cuisse plusieurs cas de succès cliniques ont également été rapportés pour le traitement de bactériémies, PAVM ou IU (**LOIEZ.C 2017**)

L'associations des carbapénèmes à des autre molécules comme la colistine, aminoglycoside la tygicycline et la fosmomycine sont synergiques in vitro (**Ferry.T et Richard J.C. 2013**) .

#### **VI.1.2.2 La polymyxine E: Colistine ®**

La colistine a longtemps été peu utilisée, notamment en raison du risque de neuro- et de néphro-toxicité. Cependant, cette molécule connaît un regain d'intérêt depuis quelques années pour lutter contre les infections dues par des bactéries multirésistantes (notamment aux carbapénèmes), ce qui a conduit l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) à classer la colistine injectable comme antibiotique de dernier recours pour la médecine humaine en 2013 (**Emilie Gay 2017**) Lors de la dernière révision de cette liste par l'OMS, les polymyxines, dont la colistine, ont été classées parmi les antibiotiques d'importance critique à priorité la plus élevée (**rapport OMS 2017**).

La colistine est utilisée en association préférentiellement avec un carbapénème ou avec la tigécycline qui est un antibiotique de la classe des glycycline( proche de tetracycline) (**Laurent P 2017** ).

#### **VI.1.2.3 Aminoglycosides**

Les BGN producteurs de carbapénémases demeurent, dans un petit nombre de cas, sensibles aux aminoglycosides (notamment les BGN producteurs de KPC et de VIM, les producteurs de NDM étant le plus souvent résistants aux aminoglycosides), en

particulier l'amikacine ou la gentamicine. En cas de sensibilité, les aminoglycosides doivent être utilisés surtout s'il s'agit d'une infection associée à des hémocultures positives ou à une PAVM.

Les aminosides doivent être utilisés en association. Les aminoglycosides ont une activité synergique avec les bêtalactamines et avec la fosfomycine

En revanche, aucune synergie ne doit être attendue avec la colistine. (T.Ferry 2015 )  
tigécycline et fosfomycine( S.BENARD Et N. AISSA 2016)

\* En outre on peut distinguer des molécules et des associations spécifiques pour chaque classe de EPC :

**VI.1.2.4 Les infections causées par les EPC de Classe A (KPC)** Les enzymes de cette classe A sont inhibées à des degrés variables par l'acide boronique, l'acide clavulanique et le tazobactam cependant En thérapeutique on peut utiliser des associations à base de l'un de ces trois inhibiteurs et d'une bêtalactamines tel que AUGMENTIN ® (Amoxicilline+ acide clavulanique). (Haute Autorité de Santé AUGMENTIN 2015 )

**VI.1.2.5 Les infections causées par les EPC de Classe B – Métallo-enzyme, inhiber par EDTA** VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) NDM (New-Dehli metallo-β-lactamase)

les alternatives possible pour cette classe sont :

- l'aztreonam seul et en association avec avibactam .
- Ceftriaxone + Sulbactam + EDTA.

**VI.1.2.5.1 Aztréonam en monothérapie et en association avec l'Avibactam :**

Les carbapénémases hydrolysent l'aztréonam, sauf les métallo-bêtalactamase ,l'utilisation de l'aztréonam à forte dose est associée à une moindre mortalité, par rapport aux autres bêtalactamines (T. Ferry et J.C. Richard 2013) .

Toutefois, il faut être prudent car les BGN producteurs de métallo-bêtalactamase coproduisent souvent une bêtalactamase à spectre étendu qui, elle, hydrolyse l'aztréonam et le rend inactif.\_c'est pourquoi il est proposé d'associer l'avibactam a l'aztreonam. (D.YOHEI ET ALL 2015) .

#### **VI.1.2.5.2 Ceftriaxone + Sulbactam + EDTA :**

L'ajout de l'EDTA comme agent de rupture de la résistance à la ceftriaxone et au sulbactam agit en interférant avec la stabilité de la membrane externe des BGN en chélatant les cations et en les déplaçant de leurs sites de liaison augmentant ainsi la perméabilité de l'antibiotique. (Shashwati Nema 2017) (Tadashi Miura 2012).

#### **VI.1.2.6 Les infections causées par les EPC de Classe D OXA-48 :**

Le choix de l'antibiothérapie de cette classe est plus au moins limité il repose principalement sur C3G comme : la céftazidime .

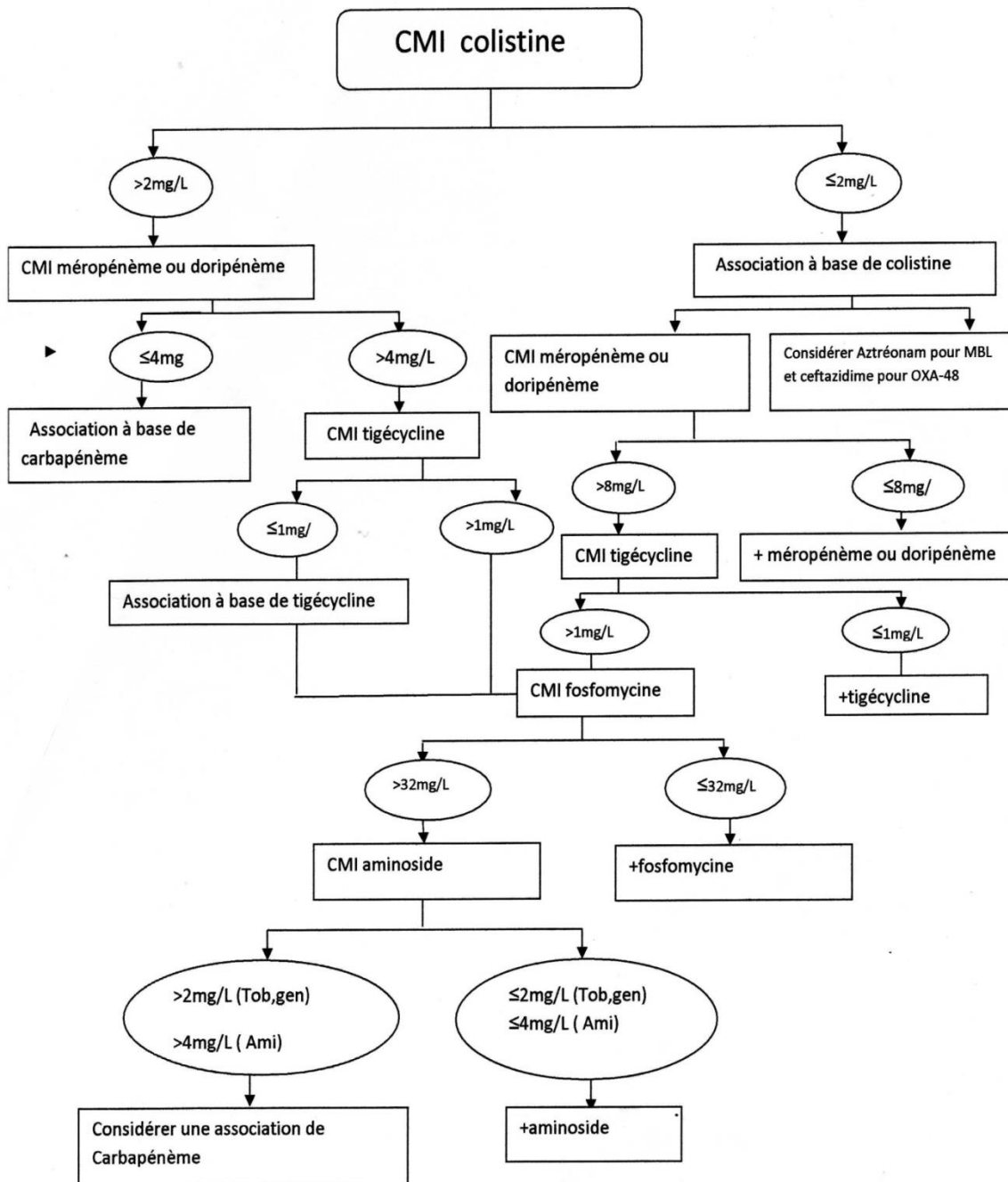
##### **VI.1.2.6.1 Céftazidime :**

Les entérobactéries qui produisent uniquement OXA-48 restent sensibles in vitro aux céphalosporines de 3e génération (C3G). Ainsi, un traitement par C3G pourrait être envisageable en l'absence de coproduction de BLSE/ céphalosporinase (environ 10 à 20 % des souches OXA-48). Dans un modèle murin de péritonite à *K. pneumoniae* OXA-48, il a été démontré que la ceftazidime était l'antibiotique le plus actif . Une autre étude a également confirmé sa bonne efficacité (à la posologie de 1 g toutes les 8 h en perfusion de 2 h) (Cattoir .V 2014).

#### **VI.1.3 Approches thérapeutiques des infections causées par les entérobactéries résistante au colistine**

Les infections causées par les entérobactéries naturellement résistantes au colistine (dans le cas des *Proteus spp*, *Morganella spp*.....) on les traitent par l'association d'amoxicilline et acide clavulanique ou C3G , cependant la résistance acquise est souvent croisée avec les BLSE et les EPC donc il faut tenir compte non seulement de la CMI de polymyxine E mais aussi les CMI de carbapénèmes et d'autre molécules qui ont une activités sur ces souches telle que tigécycline, fosfomycine, les aminosides, aztréonam et la ceftazidime.

L'algorithme ci après résume l'ensemble des possibilités thérapeutiques :



**Figure 30** : Algorithme thérapeutique des entérobactéries résistantes à la colistine (R.Bonnet 2018)



- Céphamycine (Mefoxin<sup>®</sup>)
- Céfépime (Axepim<sup>®</sup>)
- Pipéracilline+ tazobactam (Tazocilline<sup>®</sup>)
- Céflotozane+ tazobactam (Zarbaxa<sup>®</sup>)
- Ceftazidime+avibactam (Zavicefta<sup>®</sup>)
- Pivmécillinam (Selexid<sup>®</sup>)
- Témocilline (Negaban<sup>®</sup>)
- Carbapénème (imipinème, ertapénème, doripinème, méropénème)



- Les KPC:
  - betalactamine+ inhibiteur( acide clavulanique,tazobactam, acide boronique)
- Les Métallo-enzyme:
  - Cefriaxone+sulbactam+EDTA
  - Aztreonam en monothérapie ou en association avec avibactam
- Les OXA- 48:
  - Céftazidime
- Association des 3 carbapénèmes (substrat de suicide )
- Polymyxine E (Colistine<sup>®</sup>)
- Polymyxine E+ carbapénème
- Polymyxine E+tigécycline
- Tigécycline+carbapénème
- Fosfomycine+polymyxine E
- Aminoglycoside+fosfomycine+carbapénème



- Colistine+ Aztreonam
- Colistine+ ceftazidime
- Colistine+méropénème
- Colistine+méropénème+tigécycline
- Colistine+méropénème+tigécycline+ fosfomycine
- Colistine+méropénème+tigécycline+ fosfomycine+ aminoside

**Figure 31** : schéma résumant les possibilités thérapeutiques des infections causées par EMR



## **VI.2 La prévention :**

La lutte contre la diffusion des entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques. s'intègre dans une politique globale de prévention des infections nosocomiales.

Notamment par la prévention de la transmission croisée, la bonne gestion des antibiotiques et la mise en place de mesures spécifiques pour limiter l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance.

### **VI.2.1 Prévention de la transmission croisée :**

La prévention de la diffusion par transmission croisée des bactéries multirésistantes repose sur trois niveaux de précautions : les précautions standards, les précautions complémentaires et les mesures maximales

#### **VI.2.1.1 Les précautions standard : (PS)**

Les PS d'hygiène doivent être appliquées systématiquement pour tout patients, quels que soient son statut infectieux et le lieu de sa prise en charge afin de limiter la transmission croisée des BMR et assurer une protection systématique des autres patients, du personnel et de l'environnement du soin.

- L'hygiène des mains :

Les germes multirésistants colonisent les mains du personnel soignant et sont à l'origine des infections nosocomiales donc le lavage des mains doit être systématique au moins à chaque entrée et sortie de la chambre du patient ; l'utilisation des solutions hydro-alcooliques avant et après contact avec le patient et son environnement est nécessaire (**D. Pierard 2017**)

- Le port des gants :  
non stériles à usage unique sachant que les gants constituent une barrière physique.
- Le port de tenues protectrices :

. Le port d'une blouse, de sur-chaussures et des masques lors des Interventions au chevet des malades infectés est obligatoire. (**Revue SF2H 2017**)

- L'hygiène des surfaces :

La maîtrise de l'environnement avec un bio-nettoyage efficace, une désinfection et stérilisation du matériel autour des patients sont des éléments clés,

pour limiter les risques de contamination des mains des soignants lors de contact avec l'environnement et la transmission croisée des BMR. ( **CCLIN Sud-Est 2014**)

- La hiérarchisation des soins :

Les soins médicaux et paramédicaux doivent toujours commencer par les patients indemnes et se terminer par les patients porteurs de BMR. Chez ceux-ci, les soins non contaminants doivent précéder les soins contaminants ; ces derniers s'effectuent obligatoirement avec une paire de gants et sont immédiatement suivis d'un lavage antiseptique des mains, après le retrait de la paire de gants. (**GUIDE ROMAND 2017**)

- La gestion rigoureuse des excréta et déchets surtout le péril fécale qui présente le réservoir principale des entérobactéries. (**INRS 2017**)

#### **VI.2.1.2 Les précautions complémentaires « contact » :**

Les précautions complémentaires (PC) d'hygiène, sont des mesures appliquées en cas de mise en évidence de BMR telles que les EPC, BLSE En plus des PS, les précautions complémentaires consistent la prise en charge du patient. dans une chambre individuelle, ainsi que l'identification sur la porte de la chambre et dans le dossier médical du patient de ce portage.

Les PCC impliquent une prise en charge rapide des patients dont les principes sont les suivants:

- L'identification les porteurs de BMR (détection, signalisation,.....)
- Leur isolement géographique : Il repose sur l'hospitalisation en chambre individuelle des patients fortement disséminateurs de BMR , tout le matériel nécessaire aux soins du malade doit être présent dans la chambre et réservé à ce seul malade. Les entrées et les sorties dans cette chambre doivent être réduites au maximum. (**PC 2018 - SEHH - CHU Dijon**)
- La signalisation pour tous les intervenants au sein du service, elle doit être aisément reconnue par l'ensemble du personnel du service , elle se fait au moyen d'un logo connu au sein du service, non explicite pour le patient ou sa famille. Cette signalisation est recommandée sur la porte de la chambre du patient et sur le dossier médical et le portage de BMR doit être mentionné clairement dans les comptes rendus d'hospitalisation et lors des transferts des patients vers d'autres services .

- Gestion des visites et des circulations ( **Loison.C 2013**)

- La chimiodécontamination :

la chimiodécontamination digestive a pu contribuer au contrôle de situations épidémiques par l'association de deux des trois topiques suivants : aminoglycosides, polymyxine B, érythromycine base. Il est proposé, en présence d'un ou quelques cas de colonisation digestive, est ciblée sur les seuls patients colonisés à les EBBLSE (**CLIN 2017**)

**VI.2.1.3 les mesures maximales « *search and isolate* » :**

dont le but est d'empêcher la circulation des BHRe (les EPC) , les objectifs sont alors de dépister tous les cas contacts, de regrouper les cas dans des secteurs dédiés et de mettre en place un personnel spécifiquement dédié. ( **KOUJANE.L 2016**)

**VI.2.2 Une bonne gestion des antibiotiques :**

afin de réduire leur mésusage tel que la prescription probabiliste. Une politique raisonnable de l'antibiothérapie est essentielle :

- **il faut bien choisir l'antibiothérapie initiale :**

en fonction de la bactérie causale , du type d'infection et les paramètres pharmacocinétiques de pharmacodynamiques....

- **Bien maîtriser l'Association des antibiotiques :**

La monothérapie suffit pour traiter la plupart des infections courantes, cependant les associations sont à privilégier pour éviter la sélection des mutants résistants et pour obtention un effet synergique et élargir le spectre lorsqu'il y a incertitude sur la nature du germe responsable....etc

- **Arrêt de traitement :**

Une antibiothérapie prolongée favorise la sélection de souches résistantes. L'évaluation systématique à 7 jours permet de décider de l'arrêt du traitement. (**Q.TRAN 2015**)

- **Rotation d'antibiotiques :**

La rotation des antibiotiques semble être une approche nouvelle susceptible d'être efficace dans le but de diminuer l'incidence des infections nosocomiales sévères,

notamment celles dues aux bactéries à gram négatif multirésistantes. Il s'agit de limiter la prescription d'un antibiotique ou d'une classe d'antibiotiques, puis de la réintroduire « un temps » plus tard. L'objectif principal de la rotation est la diminution d'une résistance à un antibiotique ou au moins à la rendre stable, durant la période où il est non prescrit. Les différentes classes d'antibiotiques peuvent être utilisées en alternance durant une période prédéfinie, ou bien prescrites sans ordre avec rotation sans période définie (Akel.z 2014)

### VI.2.3 La mise en place de mesures spécifiques :

La lutte contre la diffusion de l'antibiorésistance doit être pragmatique et adaptée à la situation épidémiologique par la mise en place d'une stratégie convenable par exemple : le concept international « One Health, une seule santé » reconnaît que la santé humaine est étroitement dépendante de la santé des animaux et de l'environnement (1<sup>er</sup> Plan National Antibiotiques ECDC (2018-2022), comme dans le cas de la résistance à la colistine liée au plasmide mcr-1 transférable de la volaille à l'être humain donc cette approche s'applique à la conception et la mise en œuvre de programmes, de politiques, législations et travaux de recherche pour lesquels plusieurs secteurs communiquent et collaborent (OMS avec FAO et OIE) en vue de répondre aux menaces qui pèsent sur la santé publique. (OMS 2017)

# **PARTIE PRATIQUE**

---

# **CHAPITRE VII : MATERIELS ET METHODES**

---

**VII.1. Présentation de l'étude :****VII.1.1. Type et Période d'étude :**

Il s'agit d'une étude prospective réalisée au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire central du Centre Hospitalier Universitaire de Blida unité FRANTZ FANON. L'étude a été conduite sur une période de 4 mois allant du 1<sup>er</sup> janvier 2018 au 30 avril 2018.

**VII.1.2. Objectifs :**

- Caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatique de résistance des entérobactéries isolées aux bêtalactamines.
- Proposer un logigramme réalisable en routine pour la détection des mécanismes enzymatiques de résistance aux C3G et aux carbapénèmes.
- Place des entérobactéries multirésistantes parmi les BMR ;

**VII.1.3. Critères d'inclusion :**

- Notre échantillonnage est constitué des souches appartenant à la famille des entérobactéries et isolées de prélèvements reçus au laboratoire pour étude cyto bactériologique de diagnostic (hémoculture, urine, PDP...) et de dépistage (divers prélèvements des cavités naturelles : buccale, gorge, nasale, vaginale, rectal...) effectués chez les patients hospitalisées au sein du service du CAC-Hématologie.
- La caractérisation phénotypique des principaux mécanismes enzymatiques à l'origine de la multi et l'ultrarésistance a intéressé toute souche présentant une diminution des diamètres de C3G et/ou des carbapénèmes.

**VII.1.4. Critères d'exclusion :**

Ont été exclu de notre étude les souches redondantes (les doublons) : deux souches isolées chez le même patient et présentant le même antibiotype.

## VII.2. Matériels :

### VII.2.1. Appareillage :

Etuve, autoclave, bec bunsen, réfrigérateur, balance, microscope optique, pied à coulisse, densitomètre.

### VII.2.2. Matériel non biologique :

Les milieux de cultures, les tubes en verrerie, seringues, eau physiologique et eau distillée, disques d'antibiotiques.

### VII.2.3. Matériel biologique :

-Les souches d'entérobactéries isolées de différents types de prélèvements.

-Les souches de références : utilisées pour valider les différents tests effectués :

Souche *E. coli* ATCC 25922 : BLSE(-), CHN(-), carbapénèmase(-), sensible aux bêtalactamines

Souche *K. pneumoniae* connue productrice de BLSE (BLSE+),

Souche *K. pneumoniae* connue productrice de carbapénèmase (KPC).

## VII.3. Méthodes :

### VII.3.1. Recueil des données :

Le recueil des données et la constitution de l'échantillonnage a été effectuée par consultation des registres de laboratoire et du registre de conservation.

### VII.3.2. Isolement et identification des entérobactéries :

Devant tout prélèvement reçu l'identification bactérienne des entérobactéries au niveau du laboratoire s'est basée sur :

Les caractères morphologiques (coloration de gram),

Les caractères culturels et les tests d'orientation (oxydase catalase),

Les caractères biochimiques à l'aide de galerie classique ou galerie API 20E.

### VII.3.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

A été réalisé par l'antibiogramme standard selon la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton(MH) selon les recommandations du CLSI 2014, qui a été validé par les contrôles qualité nécessaires.



#### VII.3.4. Caractérisation phénotypiques des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries sélectionnées :

##### VII.3.4.1. Caractérisation phénotypiques des mécanismes enzymatique de la résistance aux C3G :

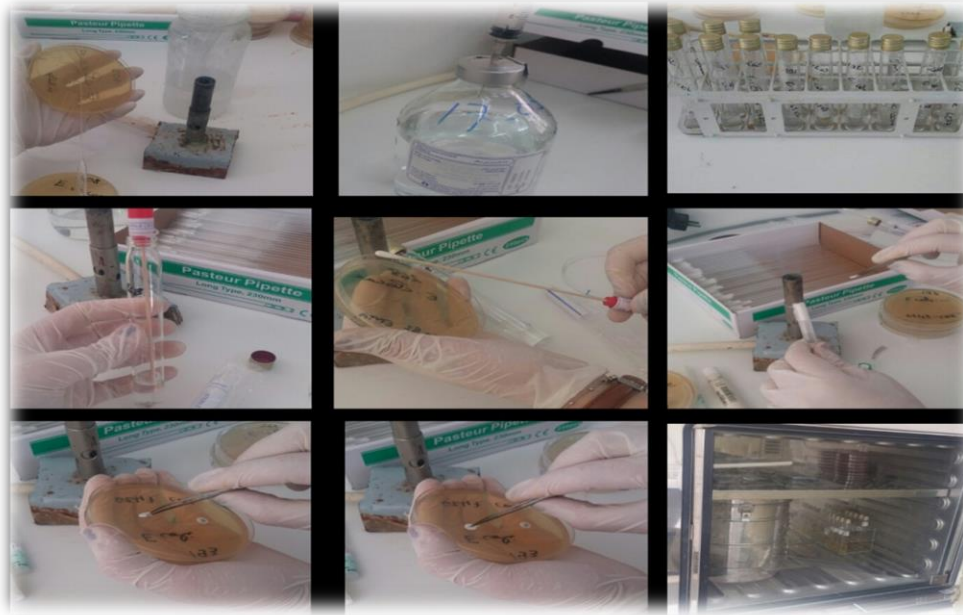
###### **VII.3.4.1.1. Test de synergie :**

On a cherché la production de BLSE pour 26 souches d'entérobactéries présentant une indication de ce test : diamètre d'inhibition de Céfotaxime (CTX) < 27mm ou de Céftriaxone (CRO) < 25mm selon les recommandations du CLSI 2014, voici le protocole suivi :

###### Protocole :

Travaillant toujours a coté du bec-bunsen dans des conditions aseptiques :

- Dans un tube stérile on prépare une suspension bactérienne (5ml eau physiologique + quelque colonie de la souche à tester) équivalente à 0.5 MC ;
- Inoculation d'une gélose Mueller Hinton par cette suspension à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- On place les disques d'antibiotique d'Amoxicilline + clavulanate 20/10 µg et céfotaxime 30µg à une distance de 30 mm (centre à centre) ;
- Incubation dans l'étuve a 35 c° pendant 16 a 24h.



**Figure 32** : les étapes de réalisation du test de synergie (**originale**)

#### Interprétation :

La production d'enzyme se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou « bouchon de champagne » entre les disques : AMC et CTX (ou AMC et CRO).

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G. Elle peut être due à :

- La production d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM)
- L'association de plusieurs mécanismes : BLSE + céphalosporinase hyperproduite.

#### **VII.3.4.1.2. Test à la Cloxacilline :**

Le test à la cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée (ou hyperproduite) selon le protocole suivant :

On a utilisé l'oxacilline au lieu de la cloxacilline à cause de la non disponibilité de cette dernière.

#### Protocole :

- L'antibiogramme sera réalisé sur MH additionné de l'oxacilline (selon le tableau ci dessous) ;
- On dépose sur la surface gélosée ensemencée les disques d'antibiotiques (B-lactamines) à tester pour les entérobactéries ;
- Incuber 18 Heures à 35°C ;
- Un contrôle de qualité sera réalisé avec les souches *E. coli* ATCC 25922.

**Tableau 11** : Préparation des boîtes de cloxacilline (ou oxacilline) (K. Rahal et al 2014)

	Entérobactéries groupe 1 et 2	Entérobactéries groupe 3
Concentration en cloxacilline	0.5mg /ml (500mg/l)	1mg/ml (1000mg/l)
Préparation de la solution	50mg de cloxa+10ml d'eau distillée	100mg de cloxa+10ml d'eau distillée
Pour une boîte ronde (90mm)	2ml de solution+18ml de MH	2ml de solution+ 18ml de MH

**Figure 33** : les étapes de la réalisation du test à l'oxacilline (**originale**)Lecture et Interprétation :

Le test à la cloxacilline est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur MH additionné de cloxacilline à celui réalisé sur MH sans cloxacilline.

Noter la différence de diamètre d'inhibition autour des C3G entre les deux tests et la restitution de l'image de synergie entre l'AMC et les C3G

L'inhibition de la céphalosporinase (Case) entraîne :

- 1) L'apparition des phénotypes sauvages de l'entérobactérie,
- Ou
- 2) L'apparition d'autres mécanismes de résistances acquises tels que :
    - Synthèse de BLSE
    - Pénicillinase
    - Imperméabilité.

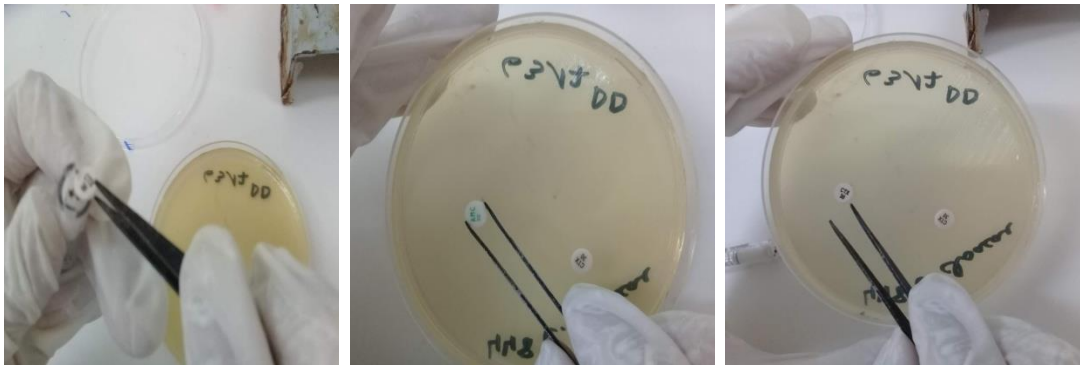
### VII.3.4.1.3 Test de double disque (test d'espagnol):

On a appliqué le test de confirmation pour les 7 souches d'entérobactéries qui sont négatifs pour les 02 tests précédents.

#### Protocole :

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

- 1) On dépose un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30mm (centre à centre) ;
- 2) Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut ;
- 3) Après 1H d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO ;
- 4) Incuber la boîte 18 H à 35°C.



**Figure 34 :** les étapes de la réalisation du test de double disque (**originale**)

#### Contrôle de qualité :

Les mêmes techniques seront réalisées en parallèle pour les souches :

- *E. coli* ATCC 25922 non productrice de BLSE.
- une souche *K. pneumoniae* connue productrice de BLSE.

#### Lecture et interprétation :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est  $\geq 5$ mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G.

VII.3.4.2. Caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes (recherche et typage des carbapénèmases) :

**VII.3.4.2.1 Recherche des carbapénèmases par le test de Hodge modifié :**

Il a été réalisé devant toute diminution du diamètre d'inhibition à l'une des carbapénèmes suivantes : ertapénème et /ou méropénème et/ou l'imipénème ;

Parmi nos souches 03 présentaient l'indication : 01 souche était résistante à l'ertapénème et 01 au méropénème ; la dernière souche était résistante aux deux molécules sus citées.

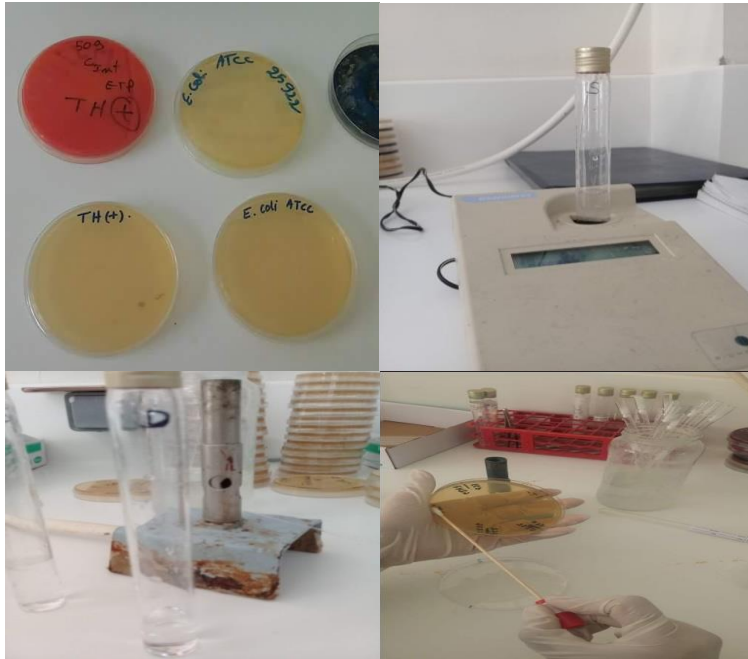
Le test de hodge était réalisé pour ces 3 souches dans une même boîte de MH selon le protocole suivant :

Protocole :

- Dans un tube stérile on prépare une suspension bactérienne d'*E.coli* ATCC 25922 à 0.5 MF dans 5 ml d'eau physiologique.

Cet inoculum est dilué au 1/10ème (0,5 ml de la suspension de 0,5 MF + 4,5 ml d'eau physiologique) ;

- On ensemence une gélose MH par cette dilution à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- On dépose au centre un disque d'ertapénème 10µg ;
- A partir du disque, on fait 3 ensemencement en strie avec les 3 souches à tester et avec deux souches de référence :- *K. pneumoniae* ATCC : carbapénèmase positive
  - *E. coli* ATCC 25922: carbapénèmase négative
- On incube à 37° C pendant 16 à 24 heures.



**Figure 35** : les étapes de réalisation de test de Hodge modifié (**originale**)

#### Interprétation :

Après 16 -24 H d'incubation, les souches productrices de carbapénèmase vont pousser jusqu'au contact du disque d'ertapénème ;

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

- Un test de Hodge modifié est négatif quand il n'y a aucune modification du diamètre d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC 25922 au contact des souches à étudier.

NB : Le test de hodge détecte la présence des carbapénèmases mais il ne peut pas typer ces enzymes.

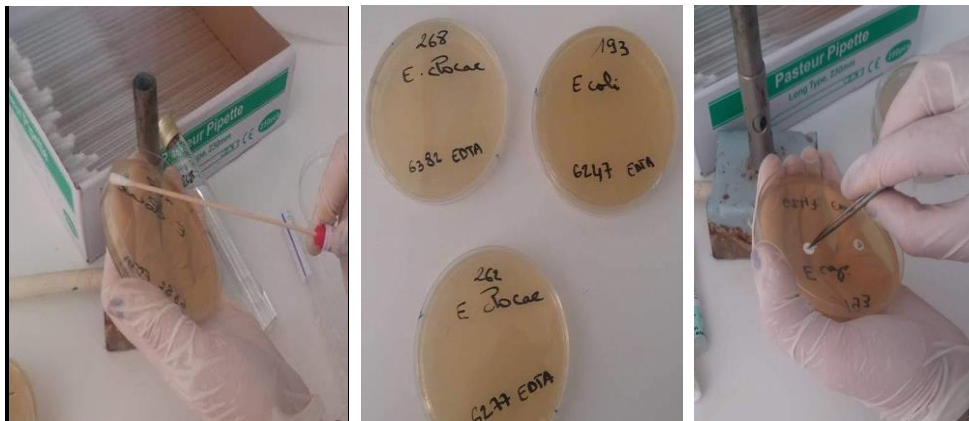
#### **VII.3.4.2.2. Typage des carbapénèmases :**

##### VII.3.4.2.2.1. Test d'inhibition par EDTA :

On a réalisé le test d'inhibition par l'EDTA pour les trois souches à la recherche d'une métallo-bétalactamase selon le protocole suivant :

- On prépare une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune.
- On ensemence une boîte de MH par cette suspension à l'aide d'un écouvillon stérile.

- On dépose un disque d'imipénème et un autre disque contenant l'EDTA combiné avec l'imipénème coté à coté dans la boîte de MH.
- On incube à 37° C pendant 16 à 24 heures.



**Figure 36** : les étapes de réalisation du test a l'EDTA (originale)

#### Interprétation :

Une augmentation du diamètre d'inhibition du disque IPM +EDTA par rapport au disque IPM seul relève la présence de l'enzyme de type métallo-carbapénémase qui a été inhibé par l'EDTA.

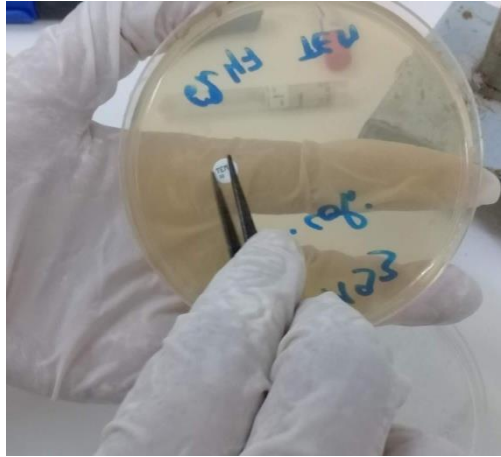
#### VII.3.4.2.2.2. Test à la témocilline :

On a testé la sensibilité de ces 3 souches à la témocilline afin de rechercher une éventuelle présence des enzymes de types OXA-48 ;

#### Protocole :

En travaillant dans les conditions standard de l'antibiogramme :

- On prépare une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune ;
- On ensemence une boîte de MH par cette suspension à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- On dépose le disque de témocilline sur la boîte de MH ;
- On incube à 37° C pendant 16 à 24 heures



**Figure 37** : Réalisation du test à la témocilline (**originale**)

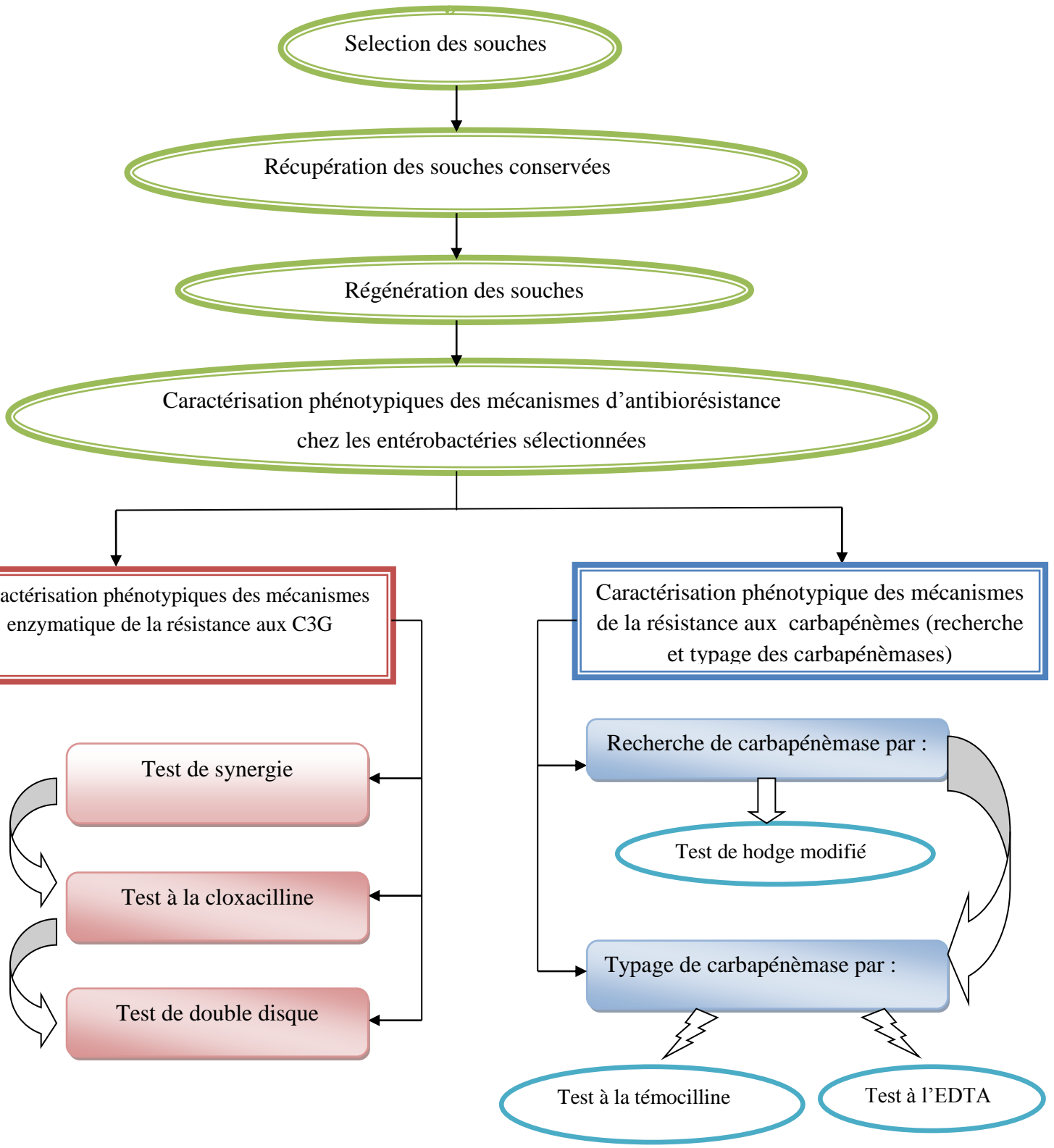
Interprétation :

Si une souche EPC résistante à la témocilline il s'agit probablement d'une carbapénèmases de type OXA-48.

Une souche est résistante à la témocilline lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque chargé à 30 $\mu$ g est inférieur à 12 mm.



Figure 38 : Logigramme du protocole suivi durant notre pratique



## **CHAPITRE VIII : RESULTATS**

---

## VIII. Résultats :

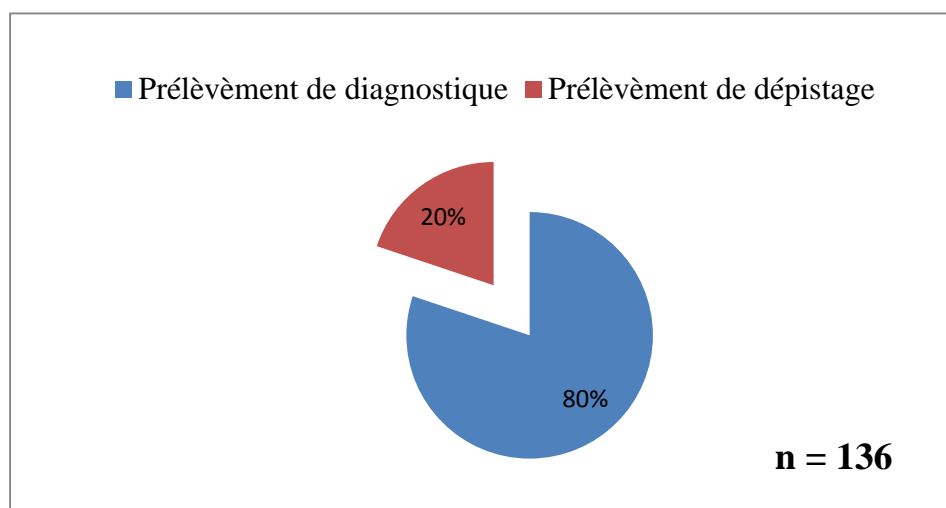
### VIII.1. Prélèvements :

#### VIII.1.1. Nature des prélèvements :

Les prélèvements à partir desquels on a isolé les entérobactéries constituant notre échantillonnage sont des prélèvements à visé diagnostique : les urines reçues pour ECBU, les hémocultures (HC), les pus, les prélèvements distaux protégés (PDP), les prélèvements sur cathéters (KT), sonde urinaire, les ponctions lombaires (PL),

Ainsi que des prélèvements de dépistage de portage de BMR, en effet :

Nous avons reçu du service CAC hématologie 136 prélèvements : 109 étaient des prélèvements à visée diagnostique et 27 des prélèvements de dépistage de BMR.



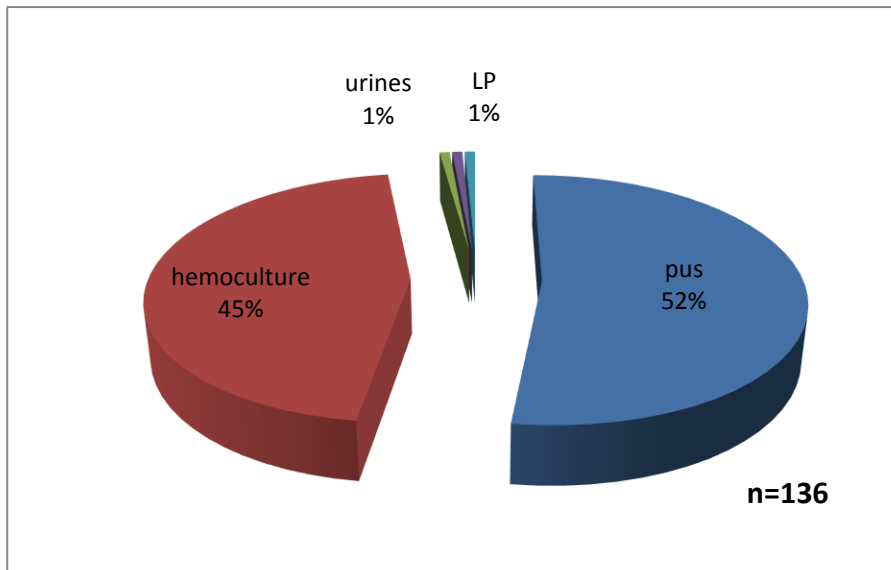
**Figure 39:** Répartition des prélèvements selon l'étude demandée

#### VIII.1.2. Répartition des prélèvements reçus selon leur type :

Sur les 136 prélèvements : 71 étaient des prélèvements des pus dont 27 étaient des prélèvements de dépistage de portage de BMR ;

62/136 étaient des hémocultures ;

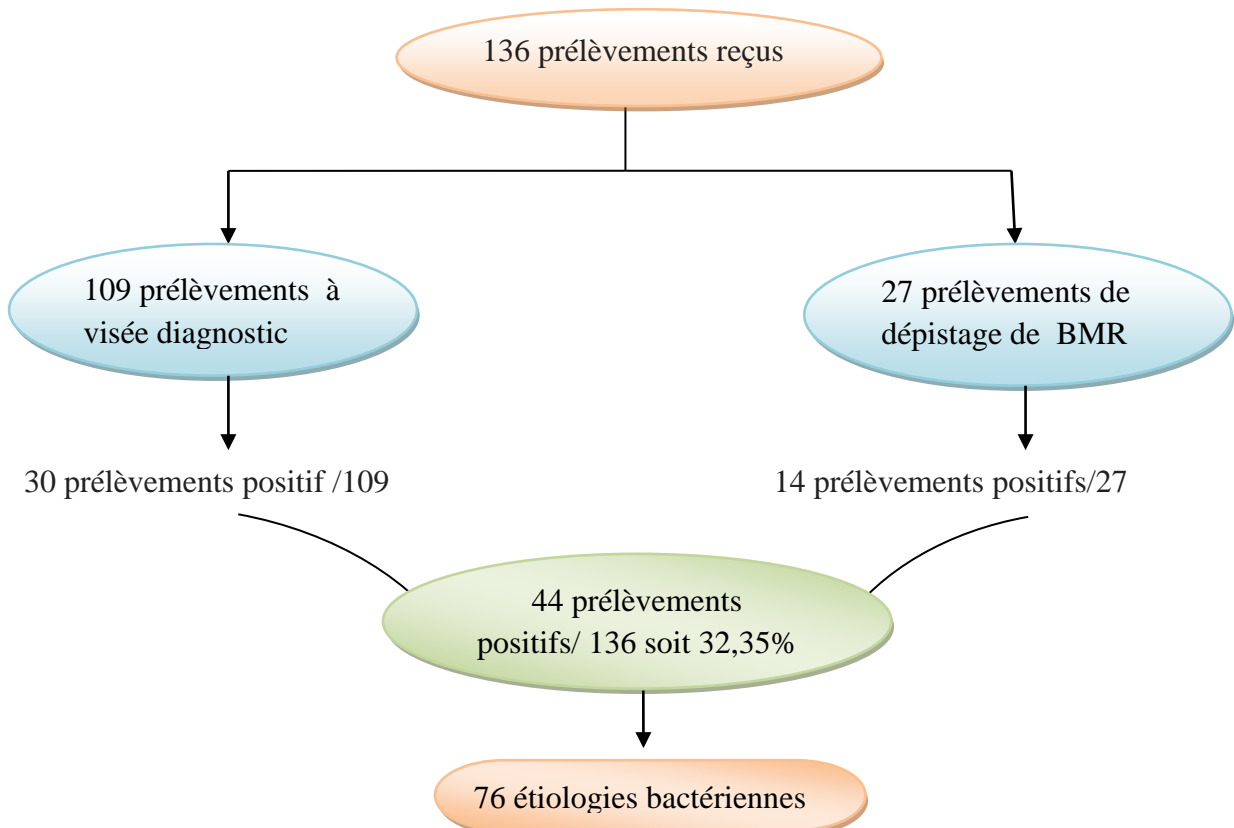
On a reçu par ailleurs une urine pour ECBU, un cathéter et un liquide de ponction



**Figure 40** : Répartition des prélèvements selon leur type

VIII.2.Taux de positivité des cultures bactériennes :

Le taux de positivité des prélèvements était égal à 32.35% (44/136) avec un isolement de 76 étiologies bactériennes.



**Figure 41** : Schéma simplifiée de la répartition des prélèvements selon l'étude demandée et le taux de positivité des cultures bactériennes

VIII.3. Place des entérobactéries parmi les bactéries isolées :

De l'ensemble des prélèvements reçus ; on a isolé 76 bactéries, plus de la moitié étaient des entérobactéries 52.63% (40 souches/76)

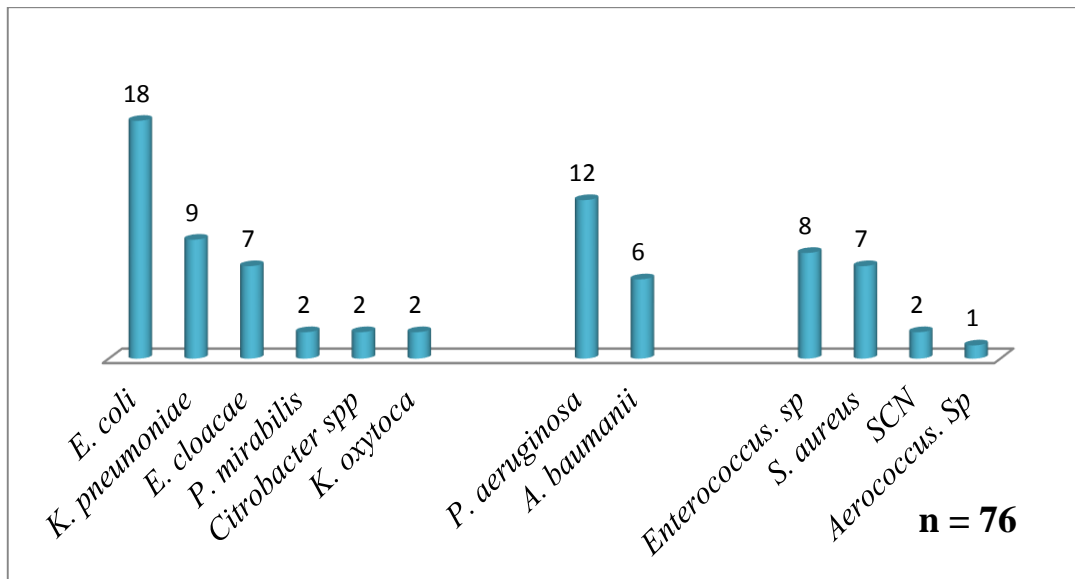


Figure 42: Répartition des bactéries isolées selon les espèces

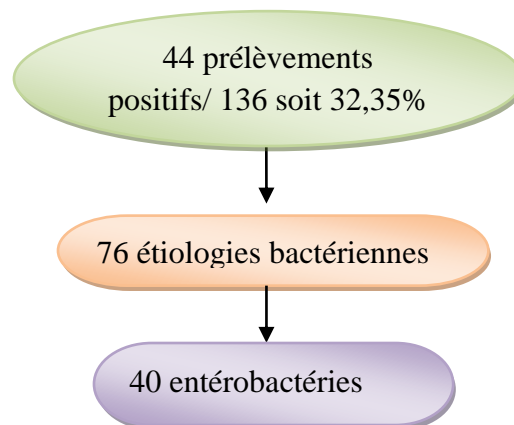
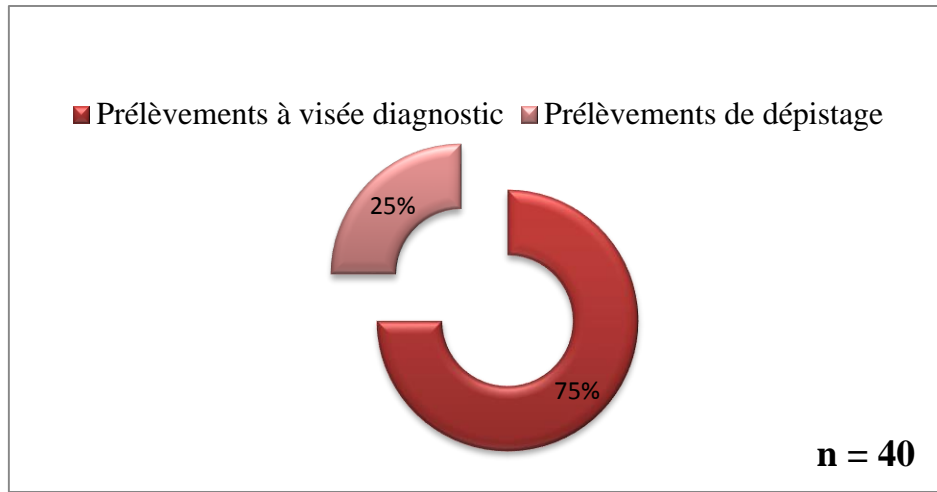


Figure 43 : Place des entérobactéries parmi les bactéries isolées

VIII.4. Répartition des entérobactéries isolées selon les prélèvements dont elles proviennent :

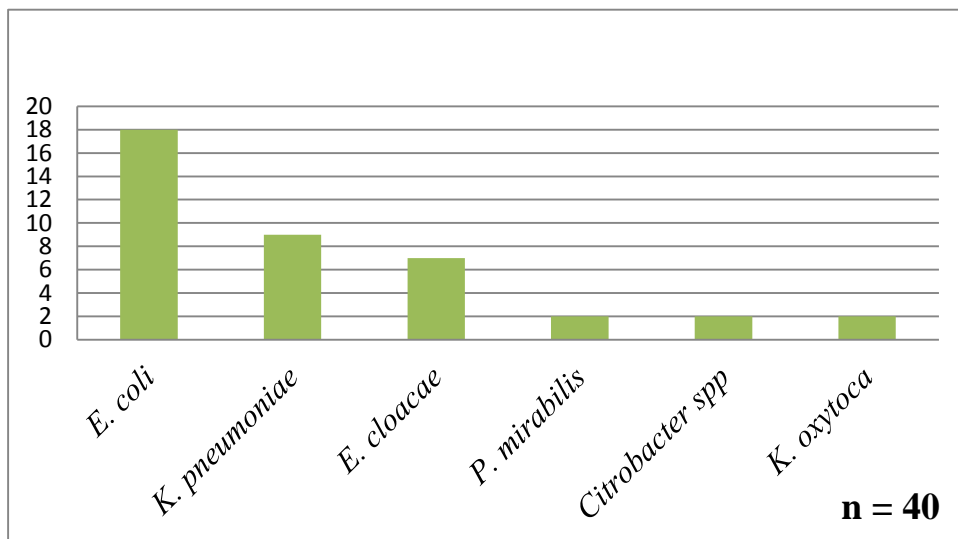
Les entérobactéries ont été isolées 30 fois dans les prélèvements à visée diagnostic dont 18 souches appartenant aux prélèvements de pus et 12 souches isolées d'hémocultures et 10 souches de prélèvements de dépistage de BMR (figure 44).



**Figure 44 :** Répartition des entérobactéries selon la visée des prélèvements

VIII.5. Répartition des entérobactéries selon les espèces auxquelles elles appartiennent:

L'espèce prédominante est *E.coli* 18 souches suivi par *K.pneumoniae* 9 souches, *E.cloacae* 7 souche, et seulement 2 souches pour chacune de *Proteus mirabilis*, *Citrobacter spp* et *K.oxytoca*.



**Figure 45:** Répartition des entérobactéries selon les espèces

Le tableau ci après résume la répartition des entérobactéries par espèce et par type de prélèvement :

**Tableau 12** : Répartition des entérobactéries par espèce et par type de prélèvement

Type de prélèvement  L'espèce	Diagnostic			Dépistage	Total par espèce
	Hémoculture	Pus	Totale du diagnostique	Pus	
<i>E. coli</i>	5	8	13	5	18
<i>K. pneumoniae</i>	4	3	7	2	9
<i>E. cloacae</i>	3	3	6	1	7
<i>Proteus mirabilis</i>	0	2	2	0	2
<i>Citrobacter. sp</i>	0	1	1	1	2
<i>K. oxytoca</i>	0	1	1	1	2
<b>Total par prélèvement</b>	12	18	30	10	40

#### VIII.6. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques :

On a porté notre intérêt sur l'antibiorésistance des 40 souches d'entérobactéries isolées; le tableau ci-après met en évidence les résultats retrouvés :

**Tableau 13** : Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries sélectionnées

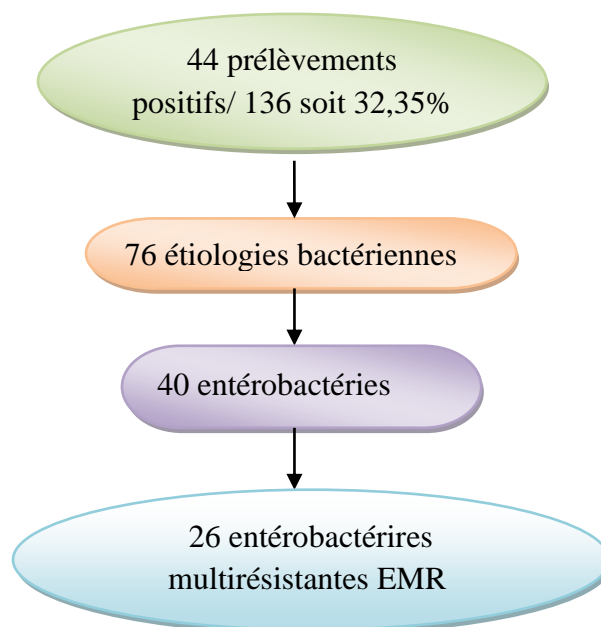
Antibiotique	Diagnostic	Dépistage	Total
	Non sensibles/ total testées	Non sensibles/ total testées	
Ampicilline	23/23	9/10	32/33
Amoxicilline	6/6	0/0	6/6
Amoxicilline/clavulanate	22/25	8/10	30/35
Cefazoline	23/27	8/10	31/37
Céftriaxone	11/17	5/7	16/24
Céfotaxime	9/12	1/3	10/15
Ciprofloxacine	11/27	4/10	15/37
Sulfamerhoxazole+triméthoprime	24/28	6/10	30/38
Amikacine	1/28	0/10	1/38
Gentamycine	15/28	4/10	19/38
Colistine	2/26	0/9	2/35
Imépènème	0/17	1/8	1/25
Meropénème	2/11	1/3	3/14
Ertapénème	2/7	0/0	2/7
Acide Nalidixique	4/12	1/6	5/18
Céfoxitine	2/2	1/1	3/3
Furanes	0/4	0/0	0/4

-D'après le tableau la résistance aux aminopénicillines concerne pratiquement l'ensemble des souches, celle aux C1G est très importante, concernant la résistance aux C3G, elle a touché 26souches/39. Pour ce qui de la ciprofloxacine, la résistance est très conséquente.

Notons l'isolement de souches résistantes aux carbapénèmes ce qui est très inquiétant. En ce qui concerne les 02 souches résistantes à la colistine il s'agit de bactéries du genre Proteus qui présente une résistance naturelle aux polymyxines



-Sur les 40 souches d'entérobactéries isolées pendant la période d'étude chez les sujets neutropéniques atteints d'hémopathies malignes, 26 souches présentaient un diamètre réduit pour les C3G et/ou carbapénèmes et sont considérées comme des entérobactéries multirésistantes EMR.

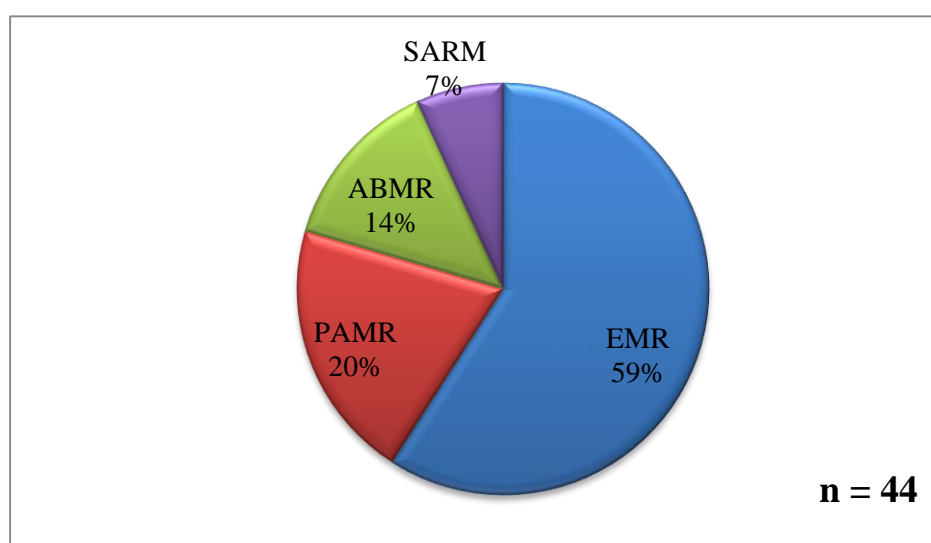


**Figure 46 :** Place des EMR parmi les entérobactéries isolées

VIII.7. Place des entérobactéries multirésistantes parmi les BMR :

Sur les 76 bactéries isolées durant les quatre mois d'étude, 44 étaient des BMR, la BMR la plus prédominante était les entérobactéries multirésistantes(EMR) qui représentent plus de la moitié du total de ces BMR avec un taux égal à 59% (26 EMR / 44 BMR).

Suivi de *P.aeruginosa* multi-résistant PAMR (9 souches), de *A.baumannii* multi-résistant ABMR (6 souches) et en fin de *Staphylococcus sp* résistant à la méticilline SRM (3 souches)



**Figure 47:** Répartition des BMR isolées selon l'espèce bactérienne.

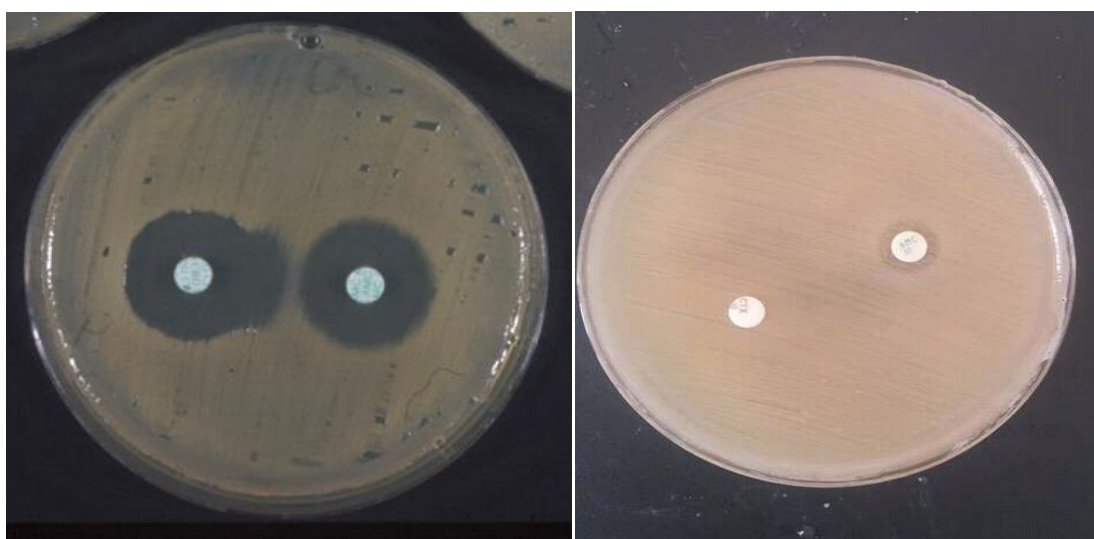
### VIII.8. Résultats de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries :

Les 26 souches d'entérobactéries sélectionnées et considérées comme des EMR ont bénéficié d'une caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques d'antibiorésistance aux bêtalactamines.

#### VIII.8.1. Résultats des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux C3G :

##### **VIII.8.1.1 Résultats du test de synergie :**

26 souches ont subi un test de synergie, 13 ont présenté un résultat positif avec apparition du bouchon de champagne (image de synergie = BLSE+):



Apparition de l'image de synergie « bouchon de champagne » : test de synergie positif	Absence de l'image de synergie : test de synergie négatif
---	---

**Figure 48 : Test de synergie (originale)**

Le tableau suivant représente les résultats du test de synergie pour chaque souche testée

**Tableau 14** : Les résultats du test de synergie pour chaque souche testée (**original**)

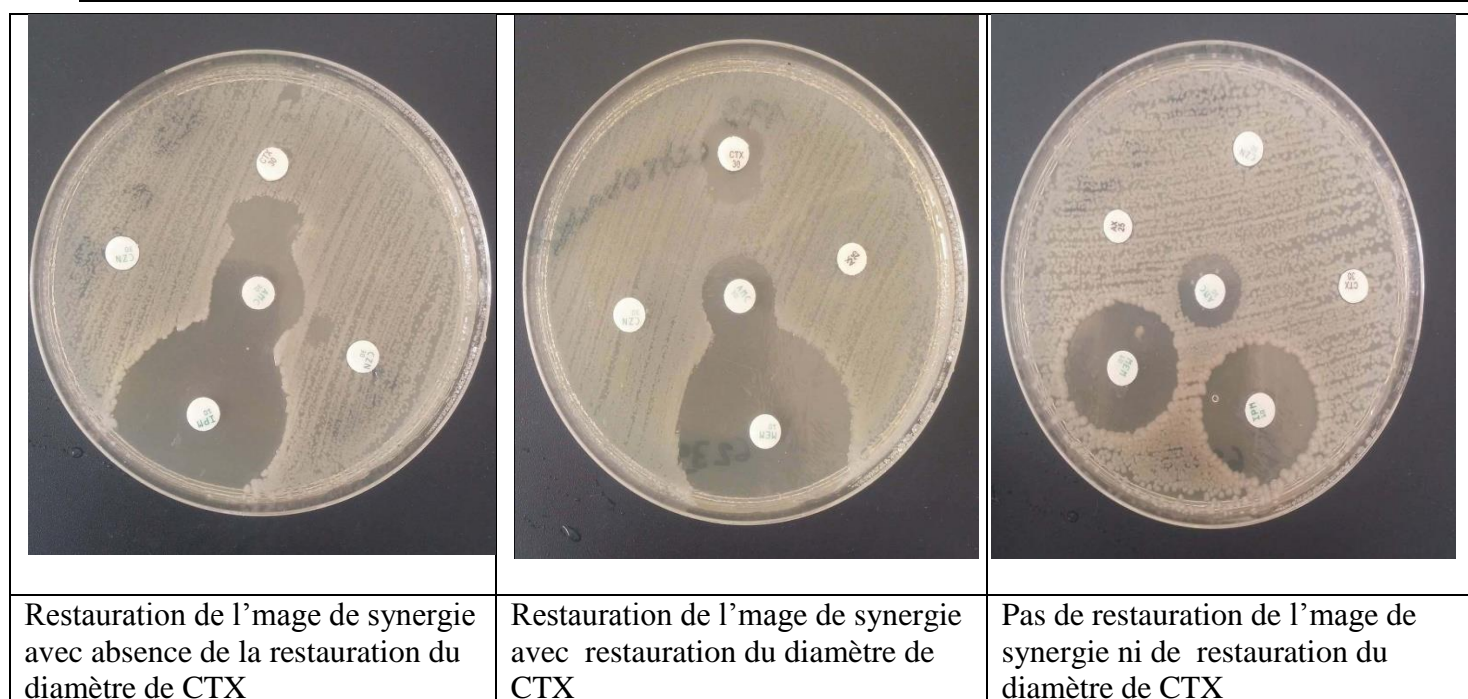
N°	N° de prélèvement	N° de conservation	Les souches (espèces)	Résultat du test de synergie
1	25	6201	<i>K.Pneumoniae</i>	-
2	42	6203	<i>E.Coli</i>	-
3	108	6349	<i>E.Cloacae</i>	-
4	173	6239	<i>Citrobacter.sp</i>	-
5	192	6246	<i>E.Coli</i>	-
6	193	6247	<i>E.Coli</i>	-
7	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	-
8	268	6273	<i>E.Cloacae</i>	-
9	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	-
10	312	6267	<i>K.Pneumoniae</i>	-
11	327	6270	<i>E.Cloacae</i>	-
12	327	6269	<i>E.Coli</i>	-
13	448	6313	<i>E.Coli</i>	-
14	72	6219	<i>K.Pneumoniae</i>	+
15	192	6244	<i>K.Pneumoniae</i>	+
16	09	6210	<i>E.Coli</i>	+
17	154	6312	<i>K.Pneumoniae</i>	+
18	173	6240	<i>K.Pneumoniae</i>	+
19	260	6276	<i>E.Coli</i>	+
20	134	6327	<i>E.Coli</i>	+
21	213	6365	<i>K.Pneumoniae</i>	+
22	268	6372	<i>K.Pneumoniae</i>	+
23	448	6317	<i>K.Oxytoca</i>	+
24	22	6209	<i>E.Coli</i>	+
25	121	6207	<i>E.Cloacae</i>	+
26	257	6367	<i>E.Coli</i>	+

**VIII.8.1.2. Résultats du test à la cloxacilline :**

Sur les 13 souches dont le test de synergie était négatif, un test à la cloxacilline a été effectué et les résultats de ce dernier sont mis en évidence dans le tableau ci-après :

**Tableau 15** : les résultats du test à la cloxacilline pour chaque souche testée (**original**)

N°	N° du prélèvement	N° de conservation	Les souches (espèces)	Résultats	
				Restauration de diamètre de C3G	Restauration de l'image de synergie
1	25	6201	<i>K.Pneumoniae</i>	-	+
2	42	6203	<i>E.Coli</i>	-	+
3	108	6349	<i>E.Cloacae</i>	-	-
4	173	6239	<i>Citrobacter.sp</i>	+	+
5	192	6246	<i>E.Coli</i>	-	+
6	193	6247	<i>E.Coli</i>	-	-
7	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	-	-
8	268	6273	<i>E.Cloacae</i>	-	-
9	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	-	-
10	312	6267	<i>K.Pneumoniae</i>	+	+
11	327	6270	<i>E.Cloacae</i>	-	-
12	327	6269	<i>E.Coli</i>	-	+
13	448	6313	<i>E.Coli</i>	+	+

**Figure 49** : Test à la cloxacilline(**originale**)

**VIII.8.1.3. Résultats du test de double disque (test d'espagnol) :**

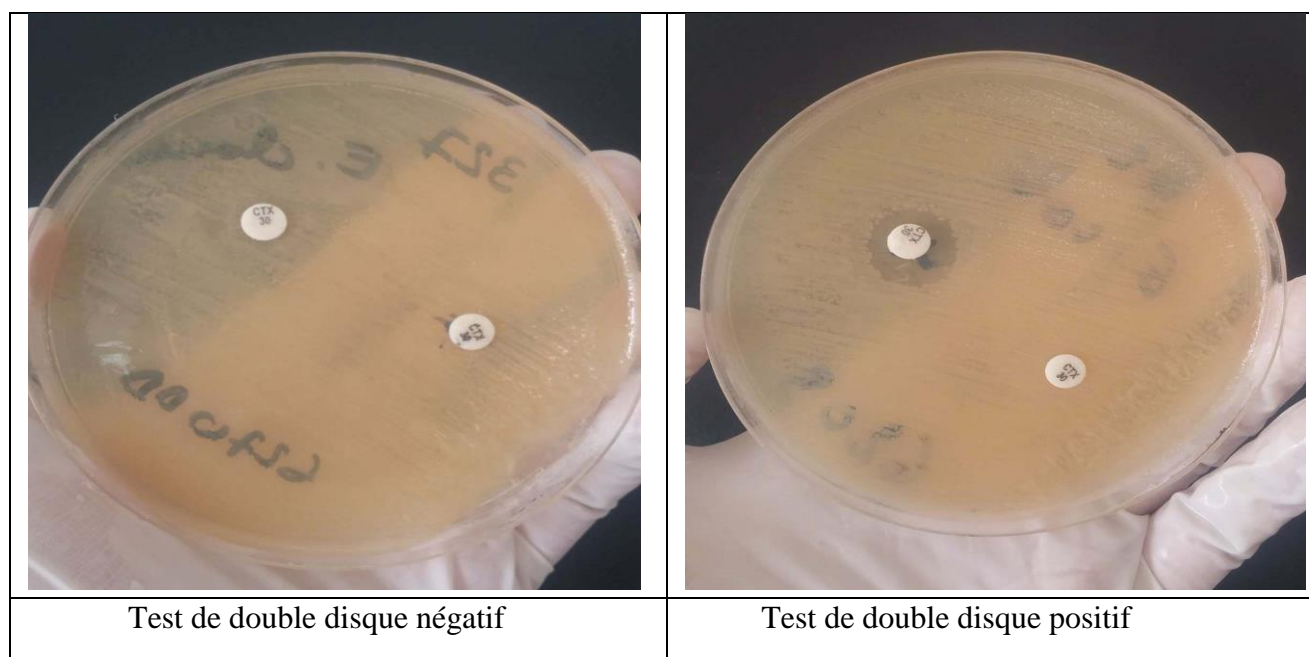
Pour les 6 souches revenues négatifs par le test de synergie et le test à la cloxacilline on a fait un test de confirmation (test de double disque).

Le tableau ci-après résume les résultats obtenus,

**Tableau 16 :** Résultat du test de double disque pour chaque souche testée (**original**)

N° de prélèvement	N° de Conservation	Les souches (espèce)	Résultat du test de double disque
108	6349	<i>E.Cloacae</i>	-
193	6247	<i>E.Coli</i>	-
262	6277	<i>E.Cloacae</i>	-
268	6273	<i>E.Cloacae</i>	-
268	6382	<i>E.Cloacae</i>	-
327	6270	<i>E.Cloacae</i>	-

Comme figurant dans les photos suivantes :

**Figure 50 :** Test de double disque (**originale**)

Le tableau suivant regroupe les résultats globaux des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux C3G

**Tableau 17 :** Résultats globaux des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux C3G :

N°	N° de Prélèvements	N° de conservation	Les souches (espèces)	Résultats				Interprétation
				Test de synergie	Test à la Cloxacilline		Test de double disque	
					Restitution du diamètre de C3G	Restitution l'image de synergie		
1	25	6201	<i>K.Pneumoniae</i>	-	-	+	NE	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
2	42	6203	<i>E.Coli</i>	-	-	+	NE	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
3	108	6349	<i>E.Cloacae</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
4	173	6239	<i>Citrobacter.sp</i>	-	+	+	NE	BLSE+ et CHN +
5	192	6246	<i>E.Coli</i>	-	-	+	NE	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
6	193	6247	<i>E.Coli</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
7	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
8	268	6273	<i>E.Cloacae</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
9	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
10	312	6267	<i>K.Pneumoniae</i>	-	+	+	NE	BLSE+ et CHN +
11	327	6270	<i>E.Cloacae</i>	-	-	-	-	BLSE-, CHN-
12	327	6269	<i>E.Coli</i>	-	-	+	NE	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
13	448	6313	<i>E.Coli</i>	-	+	+	NE	BLSE+ et CHN +
14	72	6219	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
15	192	6244	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
16	09	6210	<i>E.Coli</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
17	154	6312	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
18	173	6240	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
19	160	6276	<i>E.Coli</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
20	134	6327	<i>E.Coli</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
21	213	6365	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
22	268	6372	<i>K.Pneumoniae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
23	448	6317	<i>K.Oxytica</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +

24	22	6209	<i>E.Coli</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
25	121	6207	<i>E.Cloacae</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +
26	257	6367	<i>E.Coli</i>	+	NE	NE	NE	BLSE +

NE : non effectué

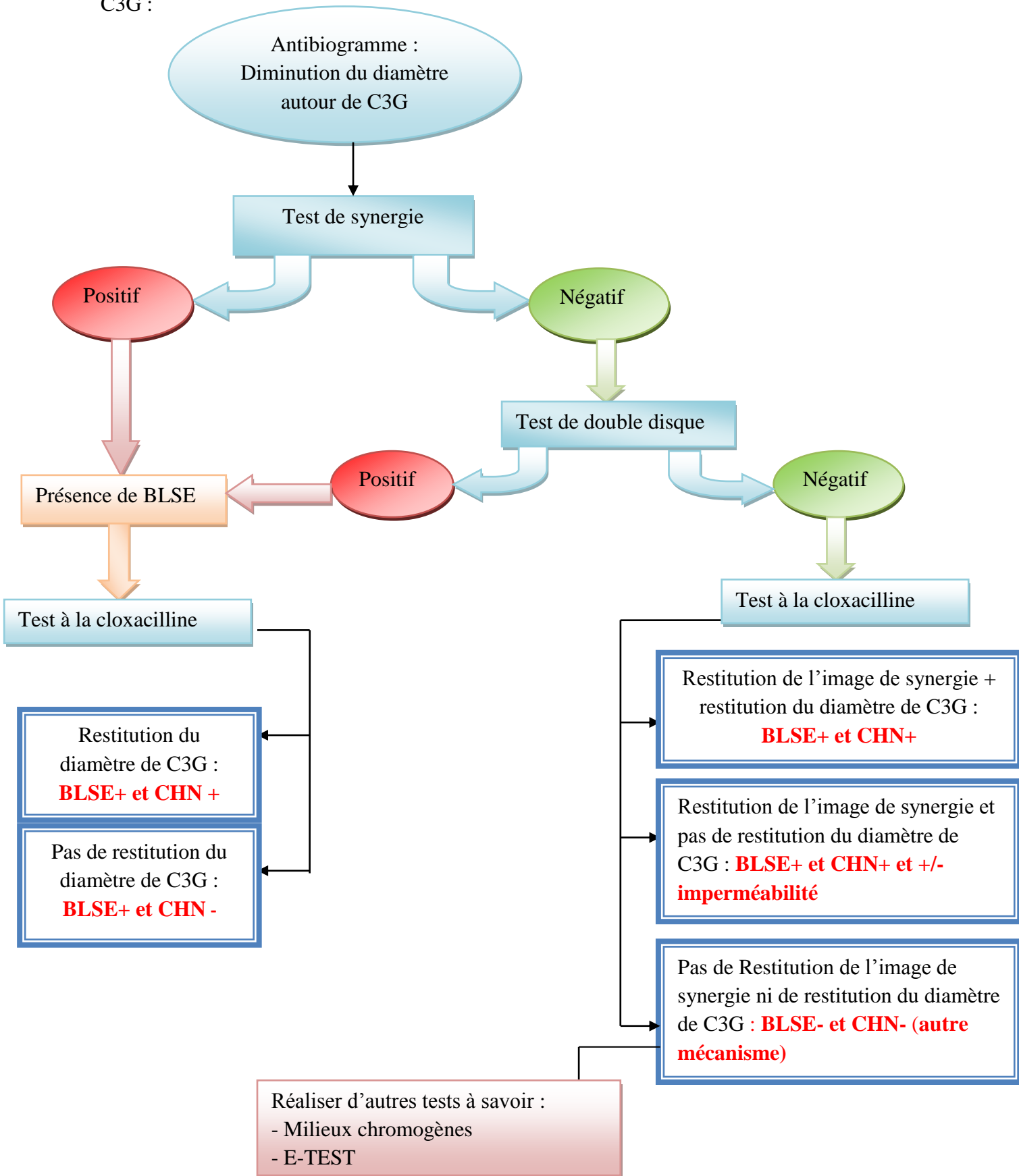
Le test de double disque n'a pas été effectué pour certain souches car il n'était pas nécessaire vu que le test de synergie était positif ou que le test à la cloxacilline a mis en évidence la restitution de l'image de synergie signe de la production de BLSE

Les souches portant les numéros allant de 14 à 24 n'ont pas bénéficié d'un test à la cloxacilline et de ce fait la production de CHN n'as pas été mise en évidence et c'est pourquoi nous avons proposé suite à l'analyse de nos résultats d'un nouveau logigramme de détection des mécanismes de résistance aux céphalosporine de 3eme génération qui permettra d'une façon aisée la détection de l'ensemble des enzymes impliquées dans de telles résistance,

Considérant ce logigramme comme un résultat émanant de l'analyse de nos résultats on le présente ci-dessous :



**Figure 51** : Logigramme pour une meilleure détection des mécanismes de résistance aux C3G :



VIII.8.2. Résultat des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes (résultat de la recherche et du typage des carbapénèmases) :

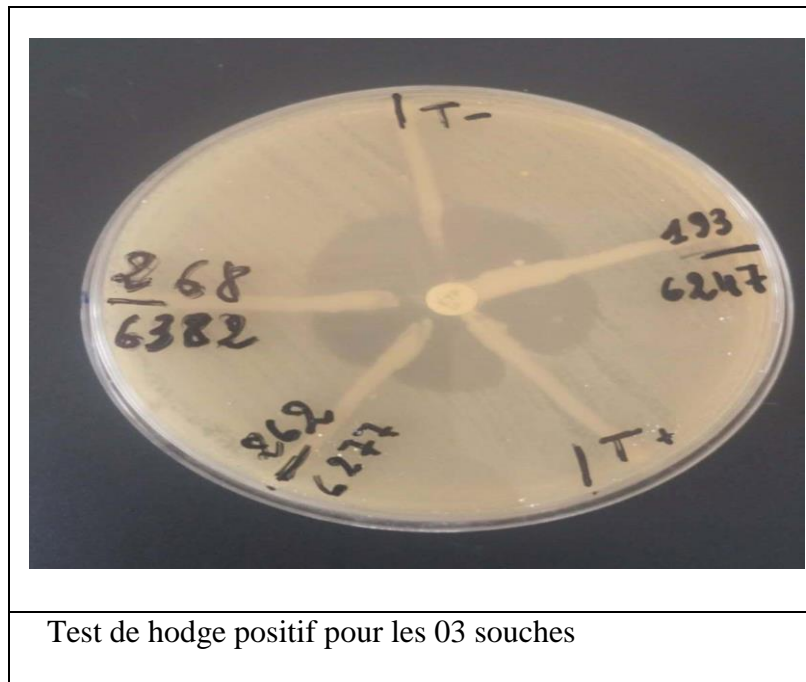
**VIII.8.2.1. Résultats de la recherche des carbapénèmases par le test de Hodge :**

03 souches avaient un diamètre réduit pour les carbapénèmes. On leur a effectué le test de Hodge , voici les résultats obtenus :

**Tableau 18 :** Résultat du test de Hodge pour chaque souche testée (**original**)

N°	N° de prélèvement	N° de conservation	Espèce	Résultats du test de hodge	Interprétation
1	193	6247	<i>E.Coli</i>	+	EPC
2	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	+	EPC
3	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	+	EPC

Les 03 souches sont productrices d'enzymes type carbapénémase, ce sont donc des EPC. Comme figurant ci-après :



**Figure 52 :** Test de Hodge (**originale**)

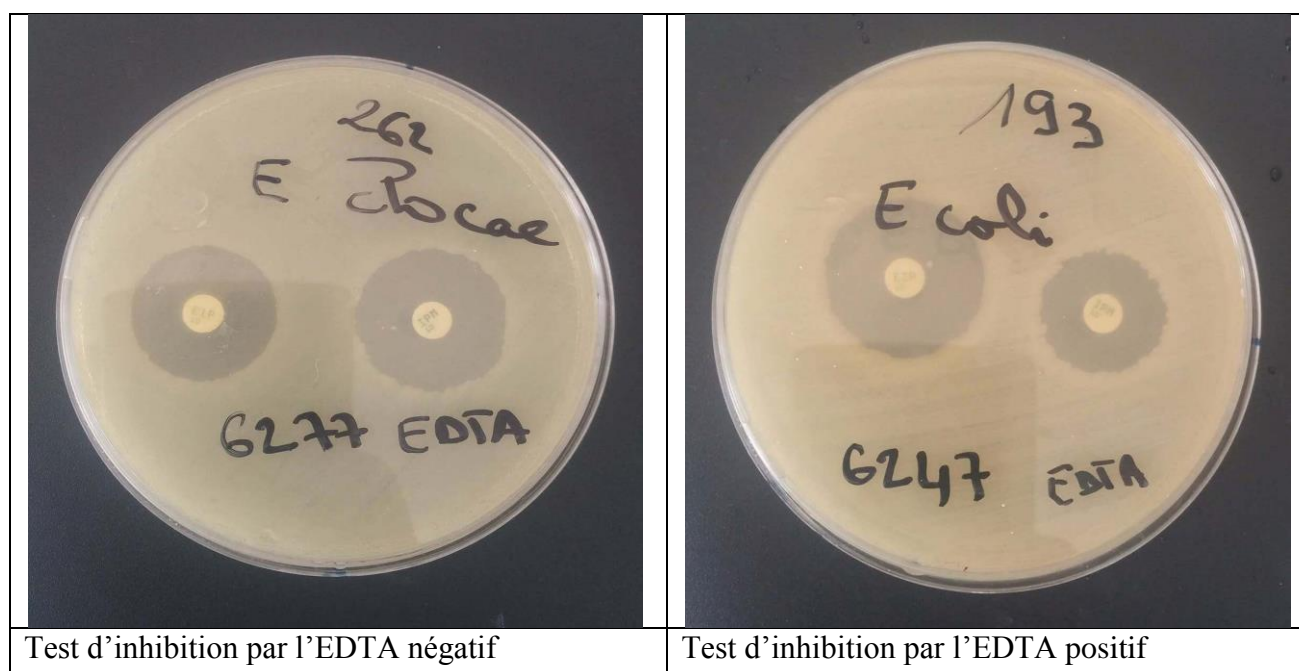
## VIII.8.2.2. Résultats du typage phénotypique des carbapénèmases :

## VIII.8.2.2.1. Résultats du test d'inhibition par l'EDTA :

Pour le typage on a appliqué le test d'inhibition par l'EDTA à la recherche de métallo-bétalactamase(M-BL) pour les 03 souches résistantes aux carbapénèmases, on a observé une augmentation du diamètre d'inhibition du disque IMP+EDTA par rapport au disque IMP seul pour une seule souche

**Tableau 19:** Résultat du test d'inhibition par l'EDTA pour chaque souche testée (original)

N°	N° du prélèvement	N° de conservation	Espèce	Résultat du test l'EDTA	Interpretation
1	193	6247	<i>E.Coli</i>	+	Métalo-bétalactamase
2	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	-	EPC non M-BL
3	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	-	EPC non M-BL



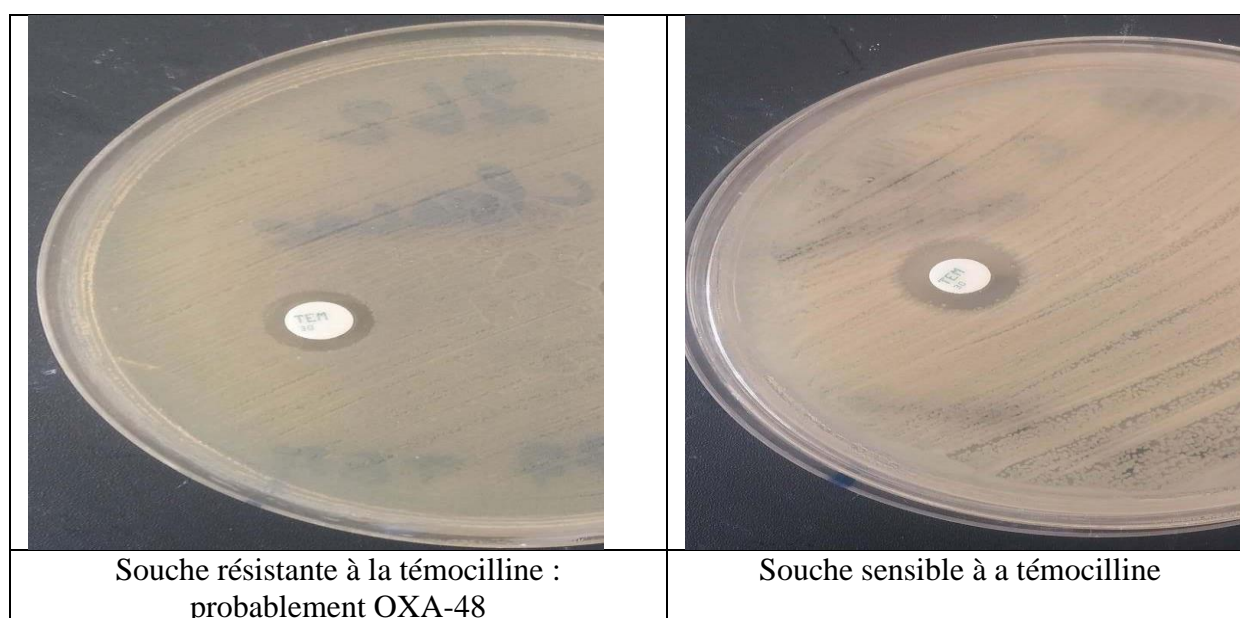
**Figure 53 :** Test d'inhibition par l'EDTA (originale)

**VIII.8.2.2.2. Résultats du test à la témocilline :**

On a réalisé le test à la témocilline pour les 03 souches EPC, une souche parmi les 03 était résistante à la témocilline, voici les résultats dans le tableau suivant:

**Tableau 20 :** Résultats du test à la témocilline pour chaque souche testée (**original**)

N°	N° du prélèvement	N° de conservation	Espèce	Résultats du test à la témocilline	Interprétation
1	193	6247	<i>E.Coli</i>	12 mm (S)	Métalo-bétalactamase non OXA-48
2	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	10 mm (R)	OXA-48 (probablement)
3	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	12 mm (S)	EPC non OXA-48

**Figure 54 :** Test à la témocilline (**originale**)

Le tableau ci-après représente les résultats globaux des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes

**Tableau 21** : Résultats globaux des tests effectués pour la caractérisation phénotypique des mécanismes de la résistance aux carbapénèmes :

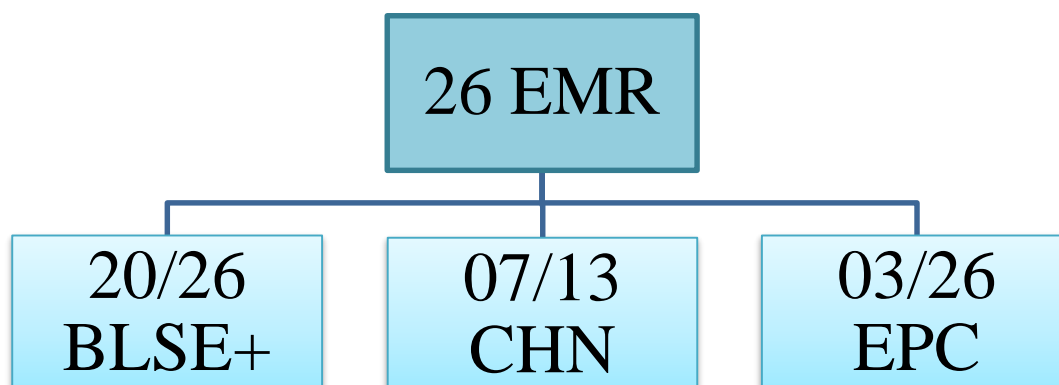
N°	N° de prélèvement	N° de conservation	Espèce	Test de Hodge	Test à l'EDTA	Test à la témocilline	Interprétation
01	193	6247	<i>E.Coli</i>	+	+	-	Métalo B-lactamase
02	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	+	-	+	OXA-48 (probable)
03	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	+	-	-	Non Métalo bétalactamase Non OXA-48

VIII.8.3. Interprétation des résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance chez les entérobactéries :

Nous avons pu constater que :

- 20 souches/ 26 étaient des E-BLSE.
- Le profil BLSE + était souvent associée à une production de CHN.
- 03 souches étaient des EPC

Voici un schéma qui résume les résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques de résistance aux bétalactamines



**Figure 55** : Schéma résume les résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques de résistance aux bétalactamines:

**Tableau 22** : Interprétation des résultats globaux des tests de la caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques de résistance aux bêtalactamines:

N°	N° de Prélèvement	N° de Conservation	Espèce	Enzymes détectées
1	25	6201	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
2	42	6203	<i>E.Coli</i>	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
3	108	6349	<i>E.Cloacae</i>	Autre mécanisme
4	173	6239	<i>Citrobacter.sp</i>	BLSE+ et CHN +
5	192	6246	<i>E.Coli</i>	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
6	193	6247	<i>E.Coli</i>	EPC : Métalo-bêtalactamase
7	262	6277	<i>E.Cloacae</i>	EPC : OXA-48(probable)
8	268	6273	<i>E.Cloacae</i>	Autre mécanisme
9	268	6382	<i>E.Cloacae</i>	EPC (non M-BL, non OXA-48)
10	312	6267	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE+ et CHN +
11	327	6270	<i>E.Cloacae</i>	Autre mécanisme
12	327	6269	<i>E.Coli</i>	BLSE+, CHN + et +/- imperméabilité
13	448	6313	<i>E.Coli</i>	BLSE+ et CHN +
14	72	6219	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
15	192	6244	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
16	09	6210	<i>E.Coli</i>	BLSE +
17	154	6312	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
18	173	6240	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
19	160	6276	<i>E.Coli</i>	BLSE +
20	134	6327	<i>E.Coli</i>	BLSE +
21	213	6365	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
22	268	6372	<i>K.Pneumoniae</i>	BLSE +
23	448	6317	<i>K.Oxytica</i>	BLSE +
24	22	6209	<i>E.Coli</i>	BLSE +
25	121	6207	<i>E.Cloacae</i>	BLSE +
26	257	6367	<i>E.Coli</i>	BLSE +

**Remarque** : comme on a obtenu une image de synergie et absence de restitution de diametre autour de C3G on a raisonné qu'il y a une impermiabilité comme un autre mecanisme de résistance associé

## **CHAPITRE IX : DISCUSSION**

---

**CHAPITRE IX : DISCUSSION :**

- A la suite de l'analyse de nos résultats on a pu constater que le nombre de prélèvements reçus au niveau du laboratoire pour analyse cyto bactériologique de prélèvements pathologiques provenant du service du CAC-Hématologique est assez important 109 prélèvements, on a également remarqué la réception de prélèvements de dépistage de BMR (26) effectués à l'admission du patient au service, le nombre global des prélèvements reçus était alors égale à 136.
  
- De l'ensemble des prélèvements : 76 étiologies bactériennes ont été détectées soit un taux de positivité de cultures de 32.25%, ainsi les infections acquises chez le sujet neutropénique atteint d'hémopathie maligne et admis au sein du CAC-hématologie (Blida) est dans pratiquement le tiers des cas d'origine bactérienne ;  
En effet les hémopathies malignes représentent à ce jour une des pathologies les plus à risque infectieux, secondaire à de multiple facteurs de risque cumulés, incluant la présence de dispositifs invasifs, la lourdeur thérapeutique et la myélosuppression ;  
**(Monique Goyette ,2012 ) ;**
  
- Cette myelosuppression engendre un état de neutropénie profonde voir l'aplasie ; qui affaibli les patients sur le plan immunitaire et les expose à un haut risque infectieux principalement bactérien d'ailleurs les infections nosocomiales sont jusqu'à deux fois plus fréquentes dans cette catégorie de patients. **(D. Mokart 2008, Dr THIEBAUT Anne, 2014)**
  
- Les entérobactéries (sujet de notre thèse) occupent la 1<sup>ère</sup> position des bactéries isolées avec prédominance d'*E.coli* ( 45% des entérobactéries) suivi par *K.pneumoniae* (22.5%) , un résultat similaire a été retrouvé dans l'étude de Mar Marin qui a avancé un taux d'isolement de BGN de 47.5% a leur tête *E.coli* et *K.pneumonia* **(MarMarin ,2014)**
  
- Concernant l'antibiorésistance des entérobactéries isolées de l'ensemble des prélèvements on a remarqué un taux de multi et d'ultra résistance assez important et inquiétant, ces phénomènes concernaient 26 souches sur 40 isolats et serait probablement dues à l'usage extensive des antibiotiques à large spectre chez ces patients notamment en antibioprofylaxie **(SAUT.J et ROUX .M 2011)**



- Selon l'exploitation des données du logiciel Whonet 5.6 du laboratoire central CHU Blida , parmi les 76 étiologies bactériennes détectées 44 étaient des BMR (57%) , prédominée par les EMR qui représentent 59.09% de l'ensemble des BMR détectées, constatation ayant déjà été mentionnée dans d'autres études telle que celle de Mar Marin et al en 2014 , qui a réalisé que 58.3% des BMR étaient des entérobactéries productrices de BLSE , et celle de Benamara M et al qui a révélé que sur une période de 06 ans (de Janvier 2011 à Décembre 2016) : sur 176 souches multirésistantes isolées 54.54% étaient des EBLSE (**Benamara.M et al 2016**)
- Suite à l'analyse des résultats de la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance plusieurs constatations et conclusions ont pu être tirées :
  - Un taux très élevé de production de BLSE ( 20 souches/26 étaient des BLSE) le profil EBLSE était fréquemment associées à la production de céphalosporinase déprimée et parfois à une imperméabilité aux C3G suspectée , cependant en aucun cas ce profil (EBLSE+) n'a été associé à la production de carbapénèmase,

Le support génétique de la production de BLSE est généralement de type plasmidique, et donc transmissible d'une bactérie à une autre. (**INRS 2015**) ; ce qui signifie un risque de transfert de la résistance élevée.

Par ailleurs la dissémination des E-BLSE entre patients est fréquente et engendre un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique. (**GagnaireJ, 2015**)

- Dans 3 cas nous n'avons pas pu détecter le mécanisme de résistance aux C3G, pour ces derniers il serait judicieux d'opter pour la méthode des 2 disques de cefoxitine et céfotétan avec inhibiteur autre que la cloxacilline tel que le RO 48-1220 et LE BRL 42715 qui semblent avoir un meilleur effet inhibiteur. (**k.Rahal et all 2014**).

- 03 entérobactéries sur 26 étaient résistantes aux carbapénèmes par production de carbapénèmase, ces souches dites EPC sont des bactéries hautement résistantes émergentes ayant un haut potentiel de transmission pouvant être à l'origine d'épidémies nosocomiales , il est fort important de détecter la production de carbapénèmases car la prévention de la diffusion des EPC diffère de celle des autres BMR nécessitant l'application de précautions type contact, ce cas particulier montre toute l'importance de

la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance vu que ces derniers peuvent conditionner les approches préventives. (PC 2018 - SEHH - CHU Dijon)

- On a typé les carbapénémases : une était une métallo- $\beta$ -lactamases , et une autre était probablement une OXA-48 , ceci dit dans le cas des typages de carbapénémases les tests phénotypiques sont parfois difficiles à interpréter et sont souvent associée à la présence de faux positifs et de faux négatifs, c'est pourquoi les techniques moléculaires sont le gold standard permettant un diagnostic de certitude alors que les tests phénotypiques n'offrent qu'un résultat présomptif ; (A.Amhal. 2017)

les techniques de biologie moléculaire offrent un diagnostic rapide, sensible et spécifique; Cependant elles restent coûteuses, c'est pourquoi d'autres alternatives doivent être envisagées telle que les techniques biochimiques (spectrométrie de masse et le Carba NP test ) répondant bien aux besoins actuels ( A.Amhal 2017)

- D'autre part on signale que nous n'avons pas pu catégoriser les entérobactéries incluses dans notre échantillonnage en XDR ou PDR parce que l'étude de la sensibilité à la colistine n'a pas pu être effectuée, celle-ci nécessitant la mise en place de la technique de microdilution en bouillon ; technique considérée comme la référence par les 02 sociétés savantes : CLSI et CA-SFM (L.Dortel 2016)

En effet les techniques de diffusion et de dilution en milieu gélosé sont peu fiables vu le haut poids moléculaire de cette molécule qui diffuse mal en gélose. ( E.Gay 2017)

Il est important de mettre en place ce test (technique de microdilution en bouillon surtout que des souches résistantes aux polymyxines E ont été détectées en Algérie selon l'alerte émise par le réseau algérien de surveillance de l'antibiorésistance.(réseau algérien du surveillance de l'antibiorésistance).

Un autre argument est en faveur de la mise en place de l'étude la résistance à la colistine est le fait qu'il s'agit d'une molécule utilisée au sein du service d'hématologie , et que le résistance à la colistine est souvent retrouvée suite à sa prescription (apparition de la résistance après traitement )

Rappelons aussi que le schéma thérapeutique incluant la colistine dépend de sa CMI d'où la nécessité de déterminer la valeur de cette dernière avant d'entreprendre le traitement (R.Bonnet 2018)

- d'une façon global il est à retenir que le présent travail fait ressortir toute l'importance de la caractérisation phénotypique avec son triple intérêts :

\* un intérêt épidémiologique : car si des souches présentent le même antibiotype avec une similitude dans les enzymes inactivatrices , ça pourrait signifier qu'ils appartiennent au même clone , ce qui faudra toute fois confirmer avec des tests génotypiques comme la MLST( MultiLocus Sequence Typing).

\* un intérêt thérapeutique vu que l'approche thérapeutique peut être conditionnée par le mécanisme impliqué dans la résistance, à titre d'exemple le traitements des infections causées par les EPC de type KPC est différent de celui des infections causées par les EPC de type Bétamétallo-lactamase (les molécules préconisées le traitement ne sont pas les mêmes).

\* un intérêt préventif sachant que les approches préventives sont conditionnés par les mécanismes d'antibiorésistance dans certains cas tel que celui des EPC où l'on doit envisager les précautions de type contact.

## **CONCLUSION**

---

## CONCLUSION :

La diffusion de souches multi-résistantes, d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinase à haut niveau ainsi que l'émergence des EPC en milieu hospitalier constitue une menace de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères.

Deux notions à retenir :

La 1ère est que le présent travail fait ressortir toute l'importance de la caractérisation phénotypique avec ses triples intérêts :

Intérêt épidémiologique : orienter vers un même clone,

Intérêt thérapeutique : vu que l'approche thérapeutique peut être conditionnée par le mécanisme impliqué dans la résistance

Intérêt préventif : les approches préventives sont conditionnés par les mécanismes d'antibiorésistance dans certains cas tel que celui des EPC où l'on doit envisager les précautions de type contact.

La seconde notion à retenir est que :

**« Une meilleur antibiothérapie implique une meilleur maitrise des risques  
d'antibiorésistance »**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## - A -

- **ABBAS. M, CHERKAOUI. A, FANKHAUSER. C, SCHRENZEL. J, HARBARTH. S.** Carbapénémases: implications cliniques et épidémiologiques pour la Suisse. *Revue médicale suisse*, 2012, vol. 8, no. 338, p. 882-4,886-9
- **AbuOun. M, Emma J. Stubberfield , Nick A. Duggett , Miranda Kirchner , Luisa Dormer , Javier Nunez-Garcia , Luke P. Randall , Fabrizio Lemma , Derrick W. Crook, Christopher Teale , Richard P. Smith and Muna F. Anjum.** mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015, *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 2745–2749
- **ADAM. F, DROUILLARD. I.** Sulfamides et associations. *Encycl Méd Chir , Maladies infectieuses*,8-004-A-10, 2003 :9 p.
- **Alfandari. S,** Epidémiologie, résistance, pression de sélection... 28<sup>ème</sup> Journée d'Actualités Médicales Arrageoise, janvier 2014
- **André S. et al.** Neutropénies fébriles dans les services d'urgence en France : résultats d'une enquête de pratique multicentrique prospective. *Journal Européen des Urgences*, 2009. 22 (Supplement 2) : A28-A29
- **AMHAL. Z :** Profil épidémiologique actuel des bactéries multirésistantes, Expérience de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech THESE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE PRESENTTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 22 /05 /2017 Thèse N° 77

## -B-

- **Baba Ahmed-Kazi Tani. Z, Arlet. G ;** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie *News of antibiotic resistance among Gram-négative bacilli in Algeria / Pathologie Biologie* 62 (2014) 169–178 ; Publié par Elsevier Masson SAS.
- **Barrial. K, Scotet. J ; 2006.** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif. *Perspective d'évolution. Tigaud de bactériologie.* 3-10.
- **Beauregard J, 2012,** développement de puces à ADN microfluidiques pour la détection de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif responsables des septicémies, *Faculté de médecine université Laval Québec.*
- **BELLINI. C a et Troillet. N b ;** Résistance aux antibiotiques : état des lieux en Europe et en Suisse et impact pour le praticien *Rev Med Suisse* 2016 ; 12 : 1699-702

- **Benamara. M, Berouaken. S, Azrou. S, Bouamra. N, Mostapha. S, Belouni. R, Talbi. M,** Bactériémies nosocomiales chez le sujet neutropénique en oncologie, 2017
- **BERNARD. L** Bactéries Hautement Résistantes traitement ; université FRANCOIS RABILAIS, Le CHRU de Tours : Sessions SF2H/SPILF 2015
- **Bertholom C 2013** ; Détection des BMR chez les entérobactéries, *OptionBio n° 485* 26 février 2013
- **Billy. C** ; Détection génotypique des résistances bactériennes : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires ; *Réanimation* 12 (2003) 192–197
- **Bogaerts P, Bouchahrouf W, Piraux A, Huang T-D, Glupczynski Y,** Colistin resistance among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae recovered in Belgium in 2014 -2015, National Reference Center (NRC) for antibiotic-resistant Gram-negative bacilli, CHU UCL
- **Boivin. S, Caux. C, Soucy. C, Allard. C,** Les entérobactéries productrices de carbapénémases *PRÉVENTION DES INFECTIONS S'UNIR POUR PRÉVENIR* novembre / décembre / 2016 / vol. 13 / n° 5 p : 53-55
- **Bonnet. R,** Présent et futur de l'antibio Présent et futur de l'antibio-résistance ; CNR de la résistance aux antibiotiques UMR Inserm 1071 usc INRA 2018
- **Bonnet. R.** CHAPITRE 15 :  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. In: Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E, eds. *ANTIBIOGRAMME*, 8<sup>ème</sup> ed. ESKA, Paris; 2012. pp. 141-161.
- **Bonnet. R.**  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. In: Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E,
- **BOUTET-DUBOIS. A, PANTEL. A, SOTTO. A, LAVIGNE. J-P,** Les entérobactéries productrices de carbapénémases, Lettre d'information du Cclin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins, (Alin&as) *avril 2012 n°2*
- **BOUTOILLE D,** Nouveaux antibiotiques ; Maladies Infectieuses et Tropicales – CHU de Nantes EA3826 : « Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections » DESC MIT 2015
- **Bru. JP 2015,** Béta Lactamases&Inhibiteurs de B lactamase à usage du clinicien 18 novembre 2015 ; Maladies Infectieuses Centre Hospitalier Annecy Genevois
- **Brun-Buisson. C** ; Le dépistage des porteurs de bactéries multirésistantes : chez quels patients ? *Réanimation* (2015) 24:S304-S314

-C-

- **Caniaux. L, van Belkum. A, Zambardi. G, Poirel. L, Gros. M-F,** MCR: modern



colistin resistance, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016

■ **CarbaNP test 2018** ; Détection biochimique rapide de l'activité carbapénémase des entérobactéries ; Le Carba NP test à partir de colonies d'entérobactéries ; CNR associé de la résistance aux antibiotiques 2018

■ **Caroda. J-F**; Guide pratique pour le dépistage des bactéries hautement résistantes ou multirésistantes dans les selles pour les laboratoires polyvalents REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - DÉCEMBRE 2014 - N°467//

■ **CARON. F**, infectiologie : service des maladies infectieuses et tropicales ; colloque ECOANTIBIO ; Rouen 2017

■ **CATTOIR V.** Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. In : ANTIBIOGRAMME COURVALAIN.P, LECLERCQ.R, BINGEN.E 2ème édition, 2006 :P349-364

■ **CATTOIR. V**, 2008. Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Mondor, AP-HP, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII, Créteil, France.

■ **CAVALLO J-D., FABRE R., JEHL F., RAPP C., GARRAB E. 2004.** Bêtalactamines. EMC Maladies Infectieuses 1 (2004) 129-202.

■ **CAZANAVE. C** : Bactériémie à entérobactéries productrices de BLSE : actualités SERVICE DES MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALE, INRA université De Bourdeaux 2015

■ **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase producing Enterobacteriaceae in acute care facilities .CRE. February 2013

■ **COMMISSION DE LA TRANSPARENCE** Avis 3 avril 2013 ; SELEXID 200 mg, comprimé pelliculé : HAS - Direction de l'Evaluation Médicale, Economique et de Santé Publique 1/15 Avis1

■ **CONNIE R. MAHON, DONALD C. LEHMAN, GEORGE MANUSELIS,**

2011. Textbook of diagnostic microbiology, fifth edition. p: 420-423

**CA-SFM / EUCAST, SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE, V1.0 JANVIER 2015**

- **CATTOIRE. V**, Traitement des infections dues à entérobactéries productrices de carbapénèmases, *Journal des Anti-infectieux* (2014) 16, 99—105
  - **CATTOIR. V**, Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques et sensibilité *in vitro* aux nouvelles molécules, *DIU National Infections Ostéo-Articulaires, janvier 2017*
  - **Chan. M** ; PLAN D’ACTION MONDIAL POUR COMBATTRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS ; Organisation mondiale de la Santé, 2016
  - **Choquet. M**, Mise en place d’un algorithme décisionnel pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) au laboratoire de bactériologie du CHU Amiens Picardie. *Sciences pharmaceutiques*. 2016. <dumas-01496957>
  - **COMITE DES EXPERTS**, Résistance à la colistine chez les bactéries à gram-négatif, *Micro/Séro/Para, rapport global Définitif 2017/2*
  - **CSS – Conseil Supérieur de la Santé** : Recommandations en matière de prévention, maîtrise et prise en charge des patients porteurs de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (MDRO) dans les institutions de soins. *CSS : 2017, Avis N°9277*
  - **Cuzon. G, Naas. T, Nordmann. P** ; Carbapénèmases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ?, *Pathologie Biologie* 58 (2010) 39–45
- D-
- **DENIS. F, PLOY .M-C, MARTIN .C, BINGEN .E, QUNTIN .R, 2011.**  
*Bactériologie médical : technique usuelles, Elsevier Masson, p : 332-334*
  - **DJELOUAT. S 2016.** *LES ENTEROBACTERIES : L'ESSENTIEL : biologie et médecine pour tous ; Copyright © 2016*
  - **Dortet L, R. Bonnin, A. Jousset, L. Gauthier, T. Naas** . Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance !. *Journal des Anti-infectieux* (2016)
  - **DORTET. L, JOUSSET.A, GAUTHIER.L, BONNIN. R, NAAS.T**, Note technique : Détection des souches d’entérobactéries productrices d’une carbapénémase, *CNR associé de la résistance aux antibiotiques, « Entérobactéries productrices de carbapénèmases ».* Hôpital de Bicêtre, Février 2018
  - **DORTET. L, POIREL. L, NORDMANN. P** ; Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases ; *feuilles de Biologie VOL LIV N° 312 – MAI 2013*

- **Dortet. L , Bonnin. R, A. Jousset , L. Gauthier , T. Naas** Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance *Journal des Anti-infectieux* , 2016
- **Drioux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., et Jarlier, V. 2008.** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and benchguide. *Clin Microbiol Infect.* 14: 90-103.eds. ANTIBIOGRAMME, 2ème ed. ESKA, Paris; 2006. pp. 141-162
- **D. Lepelletier , E. Batard , P. Berthelot , J.-R. Zahar , J.-C. Lucet , S. Fournier , V. Jarlier , B. Grandbastien** : Maîtrise de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémases : épidémiologie, stratégies de prévention et enjeux Carbapenemase- producing enterobacteria: Epidemiology, strategies to control their spread and issues Doi : 10.1016/j.revmed.2014.12.006

-E-

- **Elisabeth Baux-Pomarès.** Traitement des infections à entérobactéries sécrétrices de BLSE : alternatives aux carbapénèmes. *Sciences du Vivant [q-bio]*. 2015.
- **ÉMILE. C,** Modalités de détection des BLSE chez les entérobactéries *Biologiste*, CH de Montfermeil (93) 2008
- **EUCAST 2016** ; Recommendation for MIC determination of colistine (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST polymyxin breakpoint working group, published on : [www.eucast.org](http://www.eucast.org) 22 march 2016

-F-

- **FAUCHERE.J-L, AVRIL.J-L,** 2002. *Bactériologie générale et médicale*, 2ème édition : Ellipses, P : 141-144 et 141-158.
- **Ferry. T** ; Antibiothérapie des infections à BLSE et EPC, *Service de Maladies Infectieuses et Tropicales* 2015
- **Ferry. T, Richard. J-C** ; Traitement systémique des infections à bacilles Gram négatif producteurs de carbapénémases, *La Lettre de l'Infectiologue* • Tome XXVIII - no4 - juillet- août 2013
- **FISHER J.F., MEROUEH S.O., and MOBASHRY S. 2005.** Bacterial resistance to beta- lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev.* 105: 395-424

- **Folia. Veterinaria**, Description d'un nouveau mécanisme de résistance aux polymyxines médié par des gènes à localisation plasmidique . 2016 n°1 (a)
- **Fournier S.** Maîtrise des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe) en France : nouvelles recommandations du Haut Conseil de la santé publique Q1. *Journal des Anti-infectieux* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.03.003>
- **FRANCOIS.J, CHOMARAT.M, WEBER.M, GERARD.A** ; De l'antibiogramme à la prescription. BIOMERIEUX, 2<sup>ème</sup> édition, 2003 : p8-p22
- **FRENEY. J ; GIRARDO. P ; FREYDIERE .A ; RENAUD. F; 2007** les entérobactéries : Elsevier SAS, 2007

-G-

- **GAGNAIRE. J, VERHOEVEN. P, DENIS. C, GRATTARD. F, CARRICAJO. A, POZZETTO. B, BERTHELOT. P** ; Prise en charge des bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans les établissements de santé; feuillets de Biologie/N° 322 : 13-20 JANVIER 2015
- **Gautier. V** ; Caractérisation et expression des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes, Université P. et M. Curie ; Paris (2007).
- **Gauzit. R** ; Quelles alternatives thérapeutique aux carbapénèmes, Unité de réanimation thoracique CHU Cochin - Paris V 2014
- **Gay. E, Jouy. E, Jarrige. N, Lupo. A, Haenni. M, Madec. J-Y** , Point d'actualité sur la colistine . *Bulletin Epidémiologique* ; 2017
- **GENET. R**, Résistances et méthodes alternatives Comprendre où en est la recherche, Anses – Les Cahiers de la Recherche N° 10 - Santé, Environnement, Travail – octobre 2017
- **German GJ, Gilmour M, Tipples G, Adam HJ, Almohri H, Bullard J, Dingle T, Farrell D, Girouard G, Haldane D, Hoang L, Levett PN, Melano R, Minion J, Needle R, Patel SN, Rennie R, Reyes RC, Longtin J, Mulvey MR.** Énoncé canadien définissant la multi-résistance et l'ultra-résistance chez les souches d'entérobactéries, d'*Acinetobacter* spp. et de *Pseudomonas aeruginosa* pour les laboratoires médicaux. *Relevé des maladies transmissibles au Canada.* 2018;44(1):32-7.

- **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) World Health Organization** 2017 report: early implementation 2016-2017 ISBN 978-92-4-151344-9
  - **GLUPCZYNSKI. Y, Te-Din HUANG. D, BOGAERTS. P** ;Emergence of colistin resistance in Gram-negative bacteria ;Clinical Microbiology Laboratory 2017
  - **GOLDSTEIN F.** Sulfamides et triméthoprime; In ANTIBIOGRAMME,COURVALAIN.P, LECLERCQ.R, BINGEN.E 2ème édition, 2006 : P341-348
  - **Goulenok et al**, risk factors for developing ESBL E.COLI: can clinicians predict infection in patients with prior colonization? J HospInf 2013
  - **Goyette. M** ; La neutropénie fébrile un sujet chaud Le Médecin du Québec, volume 47, numéro 10, octobre 2012 p57 p64
  - **Grall. N, Andremont. A, Armand-Lefèvre. L** ; Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? Carbapenem resistance: Towards a new dead end? Journal des Anti-infectieux (2011) 13, 87—102
  - **Gravet A et Gessier M.** Spectrométrie de masse et microbiologie, *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 28 **2013**, pages 297-308.
  - **Griton. M**; Mécanisme de résistance des BGN aux bétactamines, DESC Réanimation, septembre 2009
- H-
- **HAUTE AUTORITE DE SANTE, COMMISSION DE LA TRANSPARENCE,** *ceftazidime/avibactam,* , avis, 30 novembre 2016
  - **HAUTE AUTORITE DE SANTE, COMMISSION DE LA TRANSPARENCE,** *ceftolozane/tazobactam,* avis 6 juillet 2016
  - **HAUTE AUTORITE DE SANTE, COMMISSION DE LA TRANSPARENCE, NEGABAN,** Avis 2015
  - **Haut Conseil de la santé publique;** Diagnostic microbiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases ou résistantes à la colistine – 6 décembre 2016
  - **Haut Conseil de la santé publique.** Relatif aux mesures à prendre par les établissements de santé en lien avec l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine (*mcr-1*) chez les entérobactéries, Avis le 27 septembre 2016

- **HENARD. S, AISSA. N** ; Traitement des infections à Entérobactéries BLSE Alternatives aux carbapénèmes, CHU Nancy , 2016
- **Holman. A-M** Étude épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémase à La Réunion de 2010 à 2015. Médecine humaine et pathologie. 2016. <dumas-01452602>

-J-

- **Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)**. Entérobactéries productrices de carbapénémases et autres bacilles Gram négatif multirésistants : mesures intérimaires de prévention et de contrôle pour les milieux d'hébergement et de soins de longue durée 2016;
- **Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)**. Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénémases dans les milieux de soins aigus du Québec, Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ), 2015

-J-

- **Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V**, Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae, *Clinical Microbiology and Infection* (2017), doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.002.
- **Jeannot. K , Arnaud Bolard, Patrick Plesiat** Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms International ; Journal of Antimicrobial Agents (2017)
- **JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M., GERARD A.** De l'antibiogramme à la prescription .Biomerieux, Nancy L'étoile, 2003, 2 ème édition : 8-31
- **Jorgensen. J-H, Ferraro. M-J 2009**; Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices, *Clin Infect Dis*, 49(11) 2009 ; pages 1749- 1755.

-K-

- **Karatuna. O, Meltem Kaya Ayas, Isin Akyar** The evaluation of the rapid polymyxin NP test for the detection of colistin resistance in Enterobacteriaceae, *J. Clin. Microbiol* 23 April 2017,

■ **Kleina J P, Gorsy T** ; Vérification des performances d'une méthode : l'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la technique des E-test®, accréditation en bactériologie, *revue francophone des laboratoires n°461* Avril 2014 ; pages 47-57

-L-

■ **LAHIRI S.D , JOHNSTONE M. R. , ROSS P. L. , MCLAUGHLIN R. E. , OLIVIER N. B. , ALM R. A.** Avibactam and Class C  $\beta$ -Lactamases: Mechanism of Inhibition, Conservation of the Binding Pocket, and Implications for Resistance ; *Antimicrob. Agents Chemother.* October 2014 vol. 58 no. 10 5704-571

■ **LAVIGNE J P** ; effets des antibiotiques et mécanismes de résistance MB7 bactériologie, Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes janvier **2007** ; page 3.

■ **LECLERCQ.R.** Macrolides-lincosamides-streptogramines In : *ANTIBIOGRAMME COURVALAIN P., LECLERCQ R., BINGEN E.* 2ème édition, 2006 :P299-324

■ **Lepelletiera D, Batardb. E, Berthelotc. P, Zahard. J-R, Lucete. J-C, Fournierf. S, Jarlierf. V, Grandbastien. B** ; Maîtrise de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémases : épidémiologie, stratégies de prévention et enjeux. *Rev Med Interne* (2015),

■ **LOIEZ. C**, LES 2 DERNIERS NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES ANTI-BGN CEFTOLOZANE- TAZOBACTAM ET CEFTAZIDIME AVIBACTAM, 10/2017

-M-

■ **MAMOD. A**, ENTEROBACTERIES RESISTANTES AUX CEPHALOSPORINES DE 3EME GENERATION : QUELLES ALTERNATIVES AUX CARBAPENEMES, THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE 2017

■ **MarMarin et al**; bloodstream infections in neutropenic patients with cancer :differences between patients with haematological malignancies and solid tumours ,*journal on infection* 2014

■ **Marcy l'Etoile France**.ChromID™ ESBL Milieu chromogène pour le dépistage des entérobactéries productrices de  $\beta$ -Lactamase à Spectre Etendu (BLSE). Isoler les colonies BLSE & Isoler les Patients. bioMérieux S.A. 69280

■ **Mirande C, Canard I, Buffet S**, Rapid detection of carbapenemase activité: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 2225-34.

■ **Mary Territo, MD**, Emeritus Professor of Medicine, Division of Hematology and Oncology, David Geffen School of Medicine at UCLA  
Neutropénie Agranulocytose ; Granulocytopenie

■ **Mokart. D, Sannini. A, Brun J-P, Blache J-L** Patient d'oncohématologie neutropénique fébrile admis en réanimation, recommandations actuelles et attitude pratique Oncohematology patients with febrile neutropenia hospitalized in ICU: Clinical practice guidelines 2008

-N-

■ **Nicolas-Chanoine. M-H** ; Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : où sont les dangers ? Réanimation (2012) 21:260-267 © SRLF et Springer-Verlag

■ **Nordman P 2010** ; Détection des BLSE chez les entérobactéries, Résistances émergentes aux antibiotique. Université Paris-Sud, Hôpital de Bicêtre. 2010.

■ **Nordmann P**. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. Med Mal Infect (2013),  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>

■ **Nordmann. P, Carrer. A** : Les carbapénèmases des entérobactéries. Archives de Pédiatrie 2010;17:S154- S162

■ **Nordmann. P, Jayol. A, Poirel L**; Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae ; the Rapid Polymyxin NP test ; Emerging Infectious Diseases • [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 22, No. 6, June 2016

-O-

■ **ONERBA Y-P, Patrick Dehaumont, Benoît Vallet** Lecture interprétative de l'antibiogramme ; CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES ET RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES EN FRANCE: SOYONS CONCERNÉS, SOYONS RESPONSABLES!, Santé Publique France ; 2017

■ **Olearo. F, Pires. D, Camus. V, Harbarth. S**, Entérobactéries productrice



de carbapénémases : stratégie de contrôle et prise en charge des patients porteurs, Swissnos Bulletin , Contrôle CPE en Suisse, centre national de prévention des infections, 2017 / 05

-P-

■ **Pak Leung, HO, Tak Chiu, WU Fifth Edition 2017 IMPACT Fifth (version 5.0) PL Ho, TC Wu, David VK Chao, Ivan FN Hung, Leo Lui, David C Lung, Tommy HC**

**Tang, Alan KL Wu.** 2017. Reducing bacterial resistance with IMPACT, 5<sup>th</sup> edition, Hong Kong Reducing bacterial resistance with IMPACT –Interhospital Multi-disciplinary Programme on Antimicrobial ChemoTherapy

■ **Philippon, A et Arlet, G. 2006.** β-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin.* 64(1): 37-51.

■ **PHILIPPON. A, ARLET. G ; 2012.** Entérobactéries et beta-lactamines : phénotypes de résistance naturelle : *Pathologie Biologie* 60 (2012) ; pages 112-126. Elsevier Masson SAS.

■ **Poirel. L,** mecanisme of colistin resistance, antimicrob agent chimother, 2017

■ **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum β-lactamases. *Clin. Microbiol Infect.* (2008);14:75-81 58).

■ **Poirel. L, Dortet. L, Nordmann. P ;** Diagnostic of carbapenemases: detection and characterization, *la Lettre de l'Infectiologue Tome XXVIII n°4 - juillet-août,* 2013 pages 128- 132.

■ **Poirel. L, Jayol. A, Nordmann. P .** Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes *Clinical Microbiology Reviews* 30(2): 557–596, 2017

■ **POYART C.** Tétracyclines. In : *ANTIBIOGRAMME COURVALAIN.P,* LECLERCQ.R, BINGEN.E. 2ème édition, 2006 : P325-334

-R-

■ **RABAUD C et MAY T.** Glycopeptides. *Encycl Méd Chir , Maladies infectieuses,* 8-004- L-10, 2007 : 7 p.

■ **RAHAL K :** livre « les antibiotiques »,2013.

■ **Rahal K, Benslimani A, Talimaamar. H, Missoum.M.F, Kechich.K, Bounar.S, Ammari.H;** Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (médecine humain et vétérinaire), 7ème édition, 2014

- **Rahal K, Benslimani A, Talimaamar. H, Missoum.M.F, Kechich.K, Bounar.S, Ammari.H;** Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6ème édition, 2011
- **Rahal, K., Belouni, R., and Benslimani, A.** 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS. 4ème édition. Algérie.* 46-52.
- **Réglier-Poupet. H, Naas. T, Carrer. A, Cady. A, Adam. J-M, Fortineau. N, Poyart. C and Nordmann. P ;** Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum b-lactamases, *Journal of Medical Microbiology* (2008), 57, 310–315
- **ROBINA .F, GIBOLDA. L, BONNETA. R, 2012.** Résistances naturelles et acquises aux b-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? : REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - SEPTEMBRE-OCTOBRE 2012 - N° 445 : Elsevier Masson SAS

-S-

- **SAUT. J, ROUX. M,** Chapitre 105 : Prise en charge d'une neutropénie fébrile, *URGENCES* 2011
- **Schechner et al,** *Clin Microb Infection* 2013 asymptomatic rectal carriage of bla kpc producing carbapenem resistant Enterobacteriaceae :who is prone to become clinically infected?
- **Shashwati. N, Prashant. N, Mehdi. K, Tripathi. K, Ramnani. V-K,** In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Ceftriaxone Sulbactam EDTA (CSE 1034) And Other B Lactam/ B Lactamase Inhibitors And Carbapenems Against Enterobacteriaceae: A Comparative Study ; *Journal of Medical and Dental Science Research* Volume 4~ Issue 7 (2017) Aug. pp: 18-22
- **Sridhar Rao P.N,**Dept. of Microbiology JJMMC, Davangere. Carbapenemases (serine and metallo-beta-lactamases) ([www.microrao.com](http://www.microrao.com)) 27 May 2012
- **SYNTHESE D'AVIS DE LA COMMISSION DE LA TRANSPARENCE** ZAVICEFTA, (ceftazidime/avibactam), céphalosporine et inhibiteur de  $\beta$ lactamase, Haute Autorité de Santé 2017

-T-

- **TALBERT.O**, guide pharmaco-clinique 2011, 3eme édition ; page : 946.Tunis 11 et 12 novembre 2016
- **THIEBAUT Anne**, Hématologie et prévention du risque infectieux Grenoble EJ. Ariza-Heredia, Clin Lymph, Myel Leuk, 2014

-V-

- **VALÉRIE PONTIÈS**, ÉMERGENCE EN FRANCE D'UNE NOUVELLE RÉSISTANCE PLASMIDIQUE À LA COLISTINE (GÈNE MCR-1) CHEZ LES ENTÉROBACTÉRIES, SANTÉ PUBLIQUE FRANCE CONGRÈS SF2H - 8 JUIN 2017
- **van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM** (2015) The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in GramNegative Rods. PLoS ONE 10(3): e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690
- **VAUD, VALAIS, NEUCHÂTEL, JURA ET FRIBOURG**, GUIDE PRATIQUE 2018 DE PRÉVENTION ET DE TRAITEMENT DES INFECTIONS EN ÉTABLISSEMENT MÉDICO-SOCIAL, disponible en ligne sur
- **Vaux. S, Coignard. B**, Alerte sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries en France : diffusion des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu (EBLSE) et émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), Journée européenne de sensibilisation au bon usage des antibiotiques – 18 novembre 2013
- **Victorian guideline** on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* For health services Version 2 April 2017 Dr Brett Sutton Deputy Chief Health Officer, Communicable Disease Department of Health and Human Services
- **Vodovara. D, Marcadeb. G, Raskineb. L, Malissina. I, Megarbane. B** ; Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : Épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention, La Revue de médecine interne 34 (2013) 687–693 .
- **VORA. S et AUCKENTHALER. R ; 2009**. Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique ? : Revue Médicale Suisse 2009; 5 : 1991-4

-W-

■ **WILLEY.J-M, SHERWOOD. L-M, WOOLVERTON .C-J,**

**2011:** Prescott's Microbiology, 8e Edition, p 446

-Y-

■ **Yamuna Devi Bakthavatchalam, Agila Kumari Pragasam, Indranil**

**Biswas, Balaji Veeraraghavan,** Polymyxin susceptibility testing,

interpretative breakpoints and resistance mechanism,

**Yohei Doi, MD, PhD , David L. Paterson, MBBS, PhD, FRACP, FRCPA:**

Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae ; Seminars in Respiratory and

Critical Care Medicine Vol. 36 No. 1/2015

WEBGRAPHIE:

<https://www.researchgate.net/publication/281839029> Epidemiologie et antibio-resistance des infections urinaires a enterobacteries chez l'adulte dans le CHU de Marrakech et implication therapeutique

<http://www.inspq.gc.ca>. [www.elsevier.com/permissions](http://www.elsevier.com/permissions)

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>

[www.guide.hpci.ch](http://www.guide.hpci.ch) <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2014.12.006>

[www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net)

<http://www.cpias.fr/ES/surveillance/prevalence.html> <http://www.who.int/fr>

<https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/troubles-du-sang/maladies-des-globules-blancs/neutrop%C3%A9nie>

<http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/2010/2010-BLSE-SPIILFSFHH->

# **GLOSSAIRE**

---

## GLOSSAIRE

- **Affinité** : Action physique responsable de la combinaison des corps entre eux.
- **Agent tensio-actif** : se compose de molécules amphiphiles modifiant la tension superficielle entre deux surfaces.
- **Arsenal thérapeutique** : c'est le schéma thérapeutique incluant les possibilités thérapeutiques.
- **Bactéricide** : substance ayant la capacité de tuer la bactérie.
- **Bactériostatique** : substance qui inhibe la multiplication des bactéries sans les tuer.
- **Biotype** : est un groupe d'organismes de constitution génétique similaire, dont les séquences d'ADN sont très proches.
- *Bouillon Nutritif* : est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants.
- **Ciliature péritriche** : un système de flagelles recouvrant de tous côtés la surface d'une bactérie. Permettent à la bactérie de se déplacer en tournoyant dans le milieu liquide.
- **Clone** : un groupe de cellules ou d'individus qui sont issus de la même unité ancestrale.
- **Constitutive** : qui s'exprime en permanence quel que soit les conditions (ne besoin pas d'inducteur)
- **Cytobactériologie** : est l'étude des cellules, des microbes, et déchets des cellules contenues dans le liquide prélevé dans l'organisme. Cette analyse permet de mettre en évidence les, ou l'agent infectieux en cause, au cours d'une infection.
- **Dépistage** : consiste à rechercher une ou plusieurs maladies ou anomalies dites à risques chez les individus d'une population donnée.
- **Déréprimer** : Cesser de réprimer, cesser l'action, devenir inactif.
- **Diffusion** : phénomène par lequel deux ou plusieurs fluides en contact acquièrent une répartition et des propriétés homogènes.
- **Emergence** : apparition de nouvelles propriétés.
- **Enzyme chromosomique** : (La télomérase) est une enzyme présente chez les organismes eucaryotes, et qui, lors de la réplication de l'ADN, a pour mission d'habiller les chromosomes de télomères, des séquences nucléotidiques placées à leur extrémité et servant à les préserver.
- **Enzyme constitutionnelle** : enzyme n'apparaissant qu'en présence d'un substrat et sous l'impulsion d'un inducteur

- **Enzyme plasmatique** : (enzyme de restriction) est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction.
- **Etat sauvage** : un organisme ou locus de gène qui prédomine dans les espèces naturelles ou normales.
- **Fièvre typho-paratyphoïdique** : sont provoquées par *Salmonella Typhi*, *paratyphi A*, *B* et *S*. elles sont ingérées avec une boisson ou un aliment contaminé.
- **Gélose** : est une substance nutritive favorisant ou inhibant (*selon sa composition*) la prolifération et le développement des bactéries. Il s'agit donc du milieu de culture des bactéries.
- **Hémopathie maligne** : un cancer des tissus hématopoïétiques caractérisé par un trouble de multiplication et la différenciation des cellules d'une lignée sanguine.
- **Hydrophobe** : soluble dans les acides gras (lipophile) mais insoluble dans l'eau.
- **Inductible** : qui ne s'exprime qu'en présence d'un métabolite ; l'inducteur.
- **Inhibiteur compétitif** : est un inhibiteur enzymatique qui agit en se liant à un site actif libre d'une enzyme à la place d'un substrat.
- **Inhibiteur** : est un composé dont l'action est d'inhiber (c'est-à-dire de ralentir fortement voire arrêter) une réaction chimique.
- **Inoculum** : Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.
- **Milieu chromogène** : le principe de ce milieu repose sur la présence d'un ou plusieurs substrats chromogènes permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes.
- **Mortalité** : c'est le rapport entre le nombre de décès et l'effectif moyen de la population dans un lieu donné et pendant une période déterminée.
- **Mutation ponctuelle** : est un changement de la structure du gène, affectant un à plusieurs nucléotides (entre un et dix).
- **Neutropénie** : trouble hématologique caractérisé par un taux bas de granulocytes (polynucléaires neutrophiles) dans le sang.
- **Nosocomial** : terme employé pour une maladie contractée lors d'une hospitalisation.



- **Peptidoglycane** (muréine ou mucopeptide) : est constituant essentiel de la paroi bactérienne. Il s'agit d'un polymère complexe formé par chaîne polyosidique, un ensemble de chaînes latérales peptidique identique et des ponts inter peptidiques.
- **Perméabilité** : d'un milieu poreux est la mesure de son aptitude à laisser traverser par un fluide sous l'effet d'un gradient de pression ou un champ de gravité.
- **Phénotype** : ensemble des caractères apparents d'un individu (opposé au génotype).
- **Phénotypes de résistance** : l'expression prépondérante d'un mécanisme de résistance de type enzymatique ( $\beta$ -lactamases) ou non (impermeabilité, affinité faible pour certaines PLP....), définissant un phénotype sauvage ou mieux de résistance naturelle.
  
- **Plasmide** : Élément génétique du cytoplasme (séparé et indépendant du chromosome), hébergé par un hôte bactérien et dont la réplication est autonome.
- **Portage** : en médecine infectieuse, est la capacité que possède un individu, ou un animal de transmettre un germe.
- **Prévalence** : nombre de cas d'une maladie dans une population à un moment donné, englobant aussi bien les cas nouveaux que les cas anciens.
- **Répresseur** : est une protéine régulant négativement un ou plusieurs gènes en se liant à une séquence spécifique sur l'ADN, appelée opérateur.
- **Reproductibilité** : Faculté d'être reproduit ; caractère de ce qui peut être reproduit. La reproductibilité des êtres vivants.
- **Résistance acquise** : c'est lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes.
- **Résistance naturelle** : lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné (insensibles au mode d'action de l'antibiotique).
- **Restaurer** : rétablir son activité.
- **Rétrospective** : se dit d'une réaction qui se manifeste après coup.
- **Sérine active** : une famille de protéases qui partagent le même mécanisme d'action. Elles ont pour fonction de cliver des protéines en hydrolysant leurs liaisons peptidiques. Elles sont appelées protéases à sérine car leur site actif contient un résidu de sérine qui joue un rôle essentiel dans la catalyse.
- **Sporadique** : maladie sporadique qui atteint des individus isolés d'une population (s'oppose à épidémique et à endémique)

- **Synergie** : est un type de phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant en commun ensemble créent un effet global.
- **Système d'efflux** : est un mécanisme par lequel les cellules rejettent à l'extérieur des composés toxiques : antibiotiques, métaux lourds, drogues...
- **Transposon** : Élément génétique transposable, composé d'ADN dont les terminaisons sont constituées de séquences identiques inversées, capable de réplication et d'insertion ailleurs dans le génome.

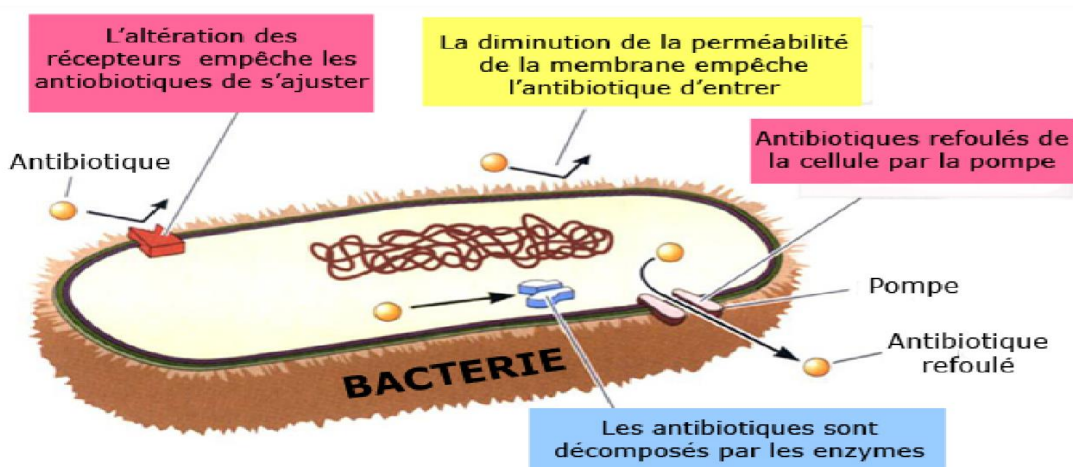
**Typage** : c'est la classification en types

# ANNEXES

---

## Annexe I

## Mécanismes de résistance à l'antibiotique



**Figure 55** : Mécanismes de la résistance bactérienne aux ATB (KHIEV.B et VEBER.B 2010)

## Annexe II

**Tableau** : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI chez les entérobactéries (K. Rahal et al 2014)

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R (<)	I	S (≥)	R (>)	I	S (≤)
Ampicilline	10µg	13	14 – 16	17	32	16	8
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	13	14 – 17	18	32/16	16/8	8/4
Céfazoline	30µg	19	20 – 22	23	8	4	2
Céfalotine	30µg	14	15 – 17	18	32	16	8
Cefoxitine	30µg	14	15 – 17	18	32	16	8
Céfotaxime	30µg	22	23 – 25	26	4	2	1
Ceftriaxone	30µg	19	20 – 22	23	4	2	1
Imipénème/Meropénème	10µg	19	20 - 22	23	4	2	1
Ertapénème	10µg	19	20 - 22	23	1	1	0,25
Amikacine	30µg	14	15 – 16	17	64	32	16
Gentamicine	10µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Acide nalidixique	30µg	13	14 – 18	19	32	---	16
Ciprofloxacine	5µg	15	16 – 20	21	4	2	1
Chloramphénicol	30µg	12	13 – 17	18	32	16	8
Colistine	-----	-----	-----	-----	2	-----	2
Furanes	300µg	14	15 – 16	17	128	64	32
Fosfomycine	200µg	12	13 – 15	16	256	128	64
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 – 15	16	4/76	-----	2/38

## *Annexe III*

### Fiches techniques

#### III.1. Méthode de diffusion en gélose

##### **1. Technique :**

##### Milieu pour antibiogramme :

Gélose de Mueller-Hinton (MH) coulé en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4mm

##### Préparation de l'inoculum :

-A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

-Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

##### Ensemencement :

\_ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

\_ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

\_ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

\_ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

\_ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

##### Application des disques d'antibiotiques :

\_ Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

\_ Tester la liste des antibiotiques

\_ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.

La liste des antibiotiques à tester pour les entérobactéries selon CLSI figure dans le tableau suivant :

Liste d'antibiotique à tester pour les entérobactéries
Ampicilline (10ug) (réponse d'interprétation valable pour l'amoxicilline)
Amoxicilline+Acide clavulanique (20 /10ug)
Aztréonam (30ug) (antibiotique testé à visée de diagnostique)
Céfalotine (30ug) (réponse d'interprétation valable pour céfalexine et céfaclor)
Céfazoline (30ug)
Céfoxitine (30ug)
Céfotaxime (30ug) (réponse d'interprétation valable pour céftriaxone, céfixime, céfoperazone, céfdinir et céfpodoxime sauf en cas de BLSE)
Céftazidime (30ug)
Imipénème (10ug)
Ertapénème (10ug)
Amikacine (30ug)
Gentamicine (10ug)
Acide nalidixique (30ug)
Ciprofloxacine (5ug)
Colistine (CMI)
Chloramphénicol (30ug)
Furane (300ug)
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole (1.25/23.75ug)
Fosfomycine (200ug)

Conditions d'incubation :

Incuber pendant 18 à 24 h à 35-37°C dans une atmosphère ordinaire

**III.2 Méthode de dilution en milieu liquide****1. Technique :****a- Milieu de culture :**

Le milieu MH liquide ajusté en cations (MHLAC)

**b- Gamme des dilutions d'antibiotique :**

\_ Dissoudre 10,24 mg de poudre titrée d'antibiotique dans le volume adéquat du solvant correspondant, pour obtenir une solution mère a 1024 µg/ml.

\_ Repartir dans des tubes stériles le milieu MHLAC, a raison de 0,25 ml par tube ou bien a raison de 25 µl par cupule en microplaque a fond rond.

\_ Réaliser a partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 512 µg/ml a 0,063 µg/ml.

**c- Préparation de l'inoculum bactérien :**

\_ Préparer a partir d'une culture pure, une suspension, dans 5 a 10 ml d'eau physiologique stérile (ou de bouillon MHLAC), d'une densité équivalente a 0,5 MF (108 CFU/ml)

\_ Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au 1/10eme pour distribuer un inoculum de 5.105 CFU/ml de germe dans chaque tube ou cupule.

\_ Vérifier par ailleurs, la pureté de chaque souche en effectuant l'isolement sur gélose non sélective.

**d- Distribution de l'inoculum bactérien :**

\_ Elle doit se faire dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum

\_ Inoculer les tubes d'antibiotiques (ou les cupules de la microplaque) avec 50 µl de suspension bactérienne par tube (ou 5 µl par cupule).

\_ Pour chaque série, réaliser un témoin sans antibiotique (tube ou cupule).

**e- Distribution du milieu MHLAC :**

\_ Repartir dans les tubes 0.70ml de MHLAC (ou 70µl / cupule) ; la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 128 µg/ml a 0.016 µg/ml.

**f- Incubation :**

\_ Recouvrir la plaque d'un couvercle en plastique (ou boucher les tubes)

\_ Incuber pendant 18h à 35°C

**2. Lecture :**

\_ La CMI de chaque antibiotique correspond au 1er tube ou a la 1ere cupule CLAIRE.

\_ Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé

\_ Classer les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat.

### III.3. Technique de dilution en gélose

#### 1. Technique

##### a- Milieu de culture :

- Milieu Mueller-Hinton en gélose liquéfié par ébullition puis maintenu a la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

##### b- Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

\_ Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique. Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).

\_ Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans le solvant approprié, jusqu'a la concentration finale de 1,25 µg/ml.

\_ Repartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

\_ Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.

La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit a une concentration finale allant de 512 µg/ml a 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.

\_ Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.

\_ Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

##### c- Préparation de l'inoculum bactérien :

\_ Préparer un inoculum standard a une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond a 1-2.108 CFU/ml en moyenne. Utiliser l'eau physiologique a 0,9% pour la préparation de la suspension directe a partir d'une culture jeune.

\_ Déposer sous forme de spots a la surface de la gélose, 104 CFU/ml par spots de 5 a 8 mm.

\_ Si on utilise un applicateur de 2µl par spot, diluer l'inoculum au 1/10ème en eau physiologique.

\_ Si on utilise un applicateur de 0,1 a 0,2µl par spot, ne pas diluer l'inoculum de départ (0,5 MF).

##### d- Dépôt des spots bactériens :

\_ Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.

\_ Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.



\_ Appliquer chaque spot sur la gélose, en utilisant un appareil de Stères, une anse calibrée ou une pipette automatique a cône stérile.

\_ Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Terminer en appliquant les spots sur une 2ème boîte témoin.

\_ Etaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incuber une nuit (détection des cultures mixtes, obtention d'une culture jeune).

e- Incubation :

\_ Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).

\_ Renverser les boîtes et incuber à 35°C pendant 18 heures.

**2. Lecture des CMI :**

\_ Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive

\_ Noter la CMI.

\_ Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film

\_ Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.

\_ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

\_ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

### III.4. CMI par E-Test

#### **1. Technique :**

##### a- Milieu :

- \_ Milieu MH coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm
- \_ Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

##### b- Préparation de l'inoculum :

- \_ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- \_ Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- \_ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Ajuster le plus précisément possible.

##### L'utilisation

d'un densitomètre est fortement souhaitable.

##### c- Ensemencement :

- \_ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- \_ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- \_ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- \_ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- \_ Ensemencer dans les mêmes conditions la souche de référence.

##### d- Dépôt de la bandelette E-test :

- \_ Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E ; à noter

que l'utilisation d'un applicateur (à commander auprès du fournisseur de bandelettes Etes)

est recommandée.

\_ Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique teste puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

\_ A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte

de 90 mm de ø (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).

\_ Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.

\_ Incuber la boîte dans les conditions requises.

## **2. Lecture :**

\_ 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 et la bandelette E-test.

\_ Contrôler la qualité du test par la CMI de la souche de référence.

\_ Lire ensuite la CMI.

\_ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

\_ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

**III.5. Test d'inhibition par l'acide boronique****1. Technique :**

Préparation des disques contenant une solution d'acide boronique :

- Prendre 120 mg d'acide phenylboronique (benzène boronic acid), le dissoudre dans 3 ml de diméthyle sulfoxyde, ajouter 3 ml d'eau distillée stérile.
- Déposer 20 µl (400µg) de cette solution dans des disques vierges et des disques contenant du céfotétan (30µg).
- Les disques sont sèches pendant 30 mn a température ambiante
- Ces disques peuvent être utilisés immédiatement ou stockés a +4 ou -70 °C (dans un étui sec)
- Ensemencer une boîte de MH avec un inoculum de 0.5 Mc Farland, déposer un disque de céfotétan (30µg) et un disque de céfotétan (30 µg) + 400µg d'acide boronique. Incuber la boîte 18 H à 35 °C.

**2. Lecture :**

Toute augmentation du diamètre d'inhibition de 5 mm, voire plus, autour du disque de céfotétan associé à l'acide boronique par rapport au disque de céfotétan seul révèle la présence d'AmpC.

## *Annexe IV*

### **Technique de BMD**

La microdilution en bouillon BMD doit être réalisée avec du sulfate de colistine dans des plaques de polystyrène non traitées sans addition de surfactant (polysorbate 80). Le milieu de bouillon Mueller-Hinton doit être ajusté aux cations, avec une composition finale de 20-25 mg / l de calcium et de 10-12,5 mg / l de magnésium. une gamme de dilutions doubles de polymyxines (allant de 0,12 à 512 µg / ml) et un inoculum bactérien final de  $5 \times 10^5$  UFC / ml dans chaque puits.

En 2017, EUCAST a ajouté un nouveau contrôle de qualité (QC) qui doit être utilisée pour contrôler les performances d'une méthode de susceptibilité à la colistine chez les entérobactéries: E. coli NCTC 18853 qui abrite le gène mcr-1, en plus de E. coli ATCC 25922.

ATCHI Safaa	ARIBI Amina
Adresse email : atchisafaa93@gmail.com	Adresse email : minapharma47@gmail.com

## **RESUME**

Les entérobactéries multi et ultrarésistantes constituent un réel problème de santé publique. L'objectif principal de ce travail est la caractérisation phénotypique des mécanismes d'antibiorésistance de ces bactéries.

Il s'agit d'une étude prospective s'étalant sur une période de 4 mois allant de Janvier à Avril 2018. L'étude a porté sur les isolats d'entérobactéries isolées au niveau du laboratoire central du CHU Blida, unité Frantz Fanon, chez les patients hospitalisés atteints d'hémopathies malignes, différents tests phénotypiques ont été effectués ce sont les tests de caractérisation phénotypique des mécanismes enzymatiques de la résistance aux C3G et aux carbapénèmes.

Nous avons reçue 136 prélèvements, et au total 76 souches bactériennes ont été isolées, 40 d'entre elles sont des entérobactéries, 26 souches d'entérobactéries présentent une diminution de diamètres autour de C3G : 20 souches était productrices des bêtalactamases à spectre élargie, dont 07 souches présentaient une coproduction de céphalosporinase à haut niveau. Et 03 souches étaient résistantes aux carbapénèmes (les 03 sont productrices de carbapénèmases).

En conclusion,

La définition précise du mécanisme d'antibiorésistance permet la mise en route du protocole thérapeutique le plus adapté et la démarche préventive la plus appropriée ; la rationalisation de la prescription des antibiotiques sont les mesures fortement recommandées permettant de limiter l'extension de la diffusion et l'émergence de ces souches multirésistantes.

### **Mots clés :**

Antibiotiques, caractérisation phénotypique, entérobactéries, multirésistance, ultrarésistance.