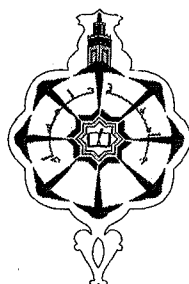


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM**  
**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**  
Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

**THESE**

Présentée par

**Mr DRISSI Mourad**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'état es-sciences

En Biologie Moléculaire et Cellulaire Option : Microbiologie

**THEME**

**Etude de la résistance aux antibiotiques de  
*Pseudomonas aeruginosa* au niveau du C.H.U. de  
Tlemcen. Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

Soutenue le

devant le jury composé de

Président	Mr Benyoucef Mohamed	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	Mr Bakour Rabah	Professeur	Université d'Alger
Examineur	Mr Moussaoui Abdallah	MC	Université de Béchar
Examineur	Mr Karam Nouredine	Professeur	Université d'Oran
Examineur	Mr Moussa Boudjemaa Boumediène	MC	Université de Tlemcen
Examineur	Mr Abdelouahid Djamel Eddine	MC	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2007-2008

مكتبة كلية العلوم  
مكتبة البيورمجيا

# REMERCIEMENTS

- Je tiens à remercier vivement Mr Boucherit Kébir, directeur du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques », de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse au sein de son laboratoire.
- Je remercie Mr Bakour Rabah , du laboratoire de Biologie moléculaire de l'université de Bab Ezzouar (Alger) pour avoir dirigé ce travail.
- Je remercie Mr Moussaoui Abdallah, Mr Karam Noureddine, Mr Moussa Boudjemaa Boumédiène , Mr Abdelouahid Djamel Eddine ,d'avoir accepté d'examiner mon travail.
- Je suis sensible à l'honneur que me fait le professeur Benyoucef Mohamed en acceptant de présider le jury de cette thèse.
- Je remercie Melle Baba Ahmed Zakat pour sa présence au laboratoire tout le long de mon travail.
- Je remercie Mme Boucherit Zahia pour son soutien.
- Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de recherche du laboratoire du Centre National de Référence « Résistance aux antibiotiques : *Pseudomonas aeruginosa* » de l'hôpital Jean Minjoz (Besançon-France) et particulièrement le professeur Patrick Plésiat pour son accueil .
- Je remercie vivement le Dr Didier Hocquet pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses encouragements, pour sa collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé et pour m'avoir fait profiter de son expérience sur les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines de *Pseudomonas aeruginosa*
- Je suis sincèrement reconnaissant envers Barbara Dehecq, technicienne du laboratoire du CNR de l'hôpital de Besançon, pour son assistance technique pendant toute la durée du stage.
- Angelin, qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour sa sympathie et son
- amitié.
- Je tiens également à remercier le personnel du CHU de Tlemcen qui m'a facilité l'accès dans leur service en particulier le Dr Benhaddouche Rachida, chef du service de réanimation du CHU de Tlemcen et le docteur Benallal ,chef du service de neurochirurgie.
- Je remercie le Dr Poirel de l'hôpital Kremlin-Bicêtre (Paris) pour la souche PU 21 CipR.
- J'ai une pensée particulière pour le Dr J.D. Cavallo de l'hôpital Begin (Paris-France) pour sa collaboration au début de mon travail.

# **DEDICACES**

*Cette thèse est dédiée à ceux qui n'ont eu de cesse de me porter et de m'encourager : qu'elle soit leur fierté*

*A mon épouse, sans ton soutien et ta complicité, tout eût été sûrement beaucoup plus difficile*

*A mes enfants,*

*A ma famille, A ma belle famille, A mes amis*

*Maman, sans ton acharnement à te battre pour l'avenir de tes enfants et sans ton amour, rien n'aurait été possible...*

*Papa, j'espère que tu es fier aujourd'hui...*

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie I. Synthèse bibliographique</b>	
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
1.1. Habitat et pouvoir pathogène.....	4
1.2. Incidence clinique.....	4
1.3. Traitement des infections à <i>P. aeruginosa</i> .....	5
2. $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de $\beta$ -lactamases.....	6
2.1. Généralités. Historique.....	6
2.2. Classification des $\beta$ -lactamines.....	8
2.3. Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....	12
2.4. Indications thérapeutiques des $\beta$ -lactamines.....	15
3. Mécanismes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques	
3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	17
3.1.1. Résistance naturelle.....	18
3.1.1.1. Imperméabilité de la paroi.....	18
3.1.1.2. Systèmes d'efflux actifs.....	20
3.1.1.3. La céphalosporinase chromosomique de <i>P. aeruginosa</i> .....	24
3.1.2. Résistance acquise.....	26
3.1.2.1. Résistance non enzymatique.....	27
3.1.2.2. Résistance enzymatique.....	31
3.2. Résistance aux aminosides.....	35
3.3. Résistance aux quinolones.....	36
<b>Partie II . Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel.....	39
1.1. Souches de référence et plasmides utilisés.....	39
1.2. Milieux de Culture.....	39
1.3. Tests biochimiques.....	39
1.4. Solutions et Tampons.....	39
1.5. Antibiotiques.....	40
2. Méthodes	
2.1. Prélèvements.....	41
2.2. Souches bactériennes.....	41
2.2.1. Isolement et identification.....	41
2.2.2. Sérotypage.....	41
2.2.3. Extraction de l'ADN plasmidique.....	42
2.2.4. Electrophorèse d'ADN plasmidique.....	42
2.2.5. Amplification aléatoire, technique RAPD.....	43
3. Etude de la résistance aux antibiotiques	
3.1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI en milieu solide)	44

3.2. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	45
3.2.1. Antibiogramme selon Vedel (2005).....	45
3.2.2. Test iodométrique.....	48
3.2.3. Test à la cloxacilline.....	49
3.2.4. Test de synergie.....	49
3.2.5. Test de Hodge.....	50
3.2.6. Test à l'EDTA.....	51
3.2.7. Test au phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide (Pa $\beta$ N).....	51
3.3. Transfert des gènes de résistance: conjugaison.....	51
4. Caractérisation de la résistance aux $\beta$ -lactamines.....	52
4.1. Isoélectrofocalisation.....	52
4.2. Etude de l'ADN par PCR.....	53
4.3. Séquençage de l'ADN.....	55

### **Partie III. Résultats et discussion**

1. Résultats et interprétations	
1.1. Souches identifiées.....	57
1.2. Résistance de <i>P. aeruginosa</i> .....	57
1.3. Répartition des mécanismes de résistance aux bêtalactamines.....	59
1.4. Résistances associées.....	67
1.5. Acquisition de la résistance.....	68
1.6. Plasmides : visualisation sur gel d'agarose.....	69
1.7. Sérotypage et analyse par RAPD.....	70
1.8. Caractérisation des bêtalactamases transférables.....	72
1.8.1. Détermination des points isoélectriques (pI).....	72
1.8.2. PCR et séquençage.....	73
2. Discussion	
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et antibiorésistance.....	75
2.2. Epidémiologie des souches.....	78
2.3. Caractérisation de la souche épidémique.....	79
<b>Conclusion.....</b>	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>84</b>
<b>Annexes</b>	<b>98</b>

# INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* est parmi les agents pathogènes les plus fréquemment impliqués au cours des infections nosocomiales (Bert,2000). Il produit des endotoxines et des enzymes protéolytiques qui favorisent sa pathogénicité (Poirel, 2006) et les infections dues à cette bactérie sont associées à une mortalité particulièrement élevée, notamment en raison de la précarité du terrain immunologique des patients chez lesquels elles surviennent mais aussi à cause des problèmes thérapeutiques liés à la résistance aux antibiotiques. En effet, les bactéries sont rapidement devenues capables de résister à l'activité antibactérienne des antibiotiques. Le pouvoir d'adaptation des bactéries se manifeste par leur capacité à acquérir de nouvelles propriétés soit par modification de leur génome soit par gain d'information génétique nouvelle. Ainsi la plupart des espèces bactériennes sont capables d'intégrer dans leur génome des déterminants de la résistance. La diffusion de gènes de résistance entre bactéries a conduit à l'apparition de bactéries dites multirésistantes, capables de résister en même temps à plusieurs familles d'antibiotiques. La résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème majeur en santé publique qui devient de plus en plus inquiétant notamment avec l'accroissement de la multirésistance des bactéries pathogènes humaines, ainsi qu'avec l'émergence rapide de nouvelles résistances à des molécules récentes. L'administration répétée des antibiotiques chez l'homme et l'animal tend à augmenter le nombre de bactéries résistantes. La plasticité du génome des bactéries leur confère un pouvoir d'adaptation et d'évolution extrêmement rapide en fonction du milieu environnant. Par le passé, les bactéries ont réussi à muter, à acquérir et transférer l'information génétique nécessaire pour résister aux antibiotiques utilisés. Le transfert horizontal des gènes de résistance entre bactéries est le principal mécanisme responsable de la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Dans la situation actuelle, il devient essentiel de détecter précocement les nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques récemment introduits sur le marché et également de comprendre les mécanismes de diffusion des gènes de résistance.

*P. aeruginosa* possède une aptitude remarquable à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance qui viennent s'ajouter à une résistance naturelle importante. Le risque d'émergence de mutants résistants en cours de traitement est élevé, ce qui contribue à accroître la mortalité au cours de ces infections (Carmeli et coll.,1999). Les

$\beta$ -lactamines, qui sont le plus souvent utilisées en association avec un aminoside ou une fluoroquinolone, occupent une place de choix dans la stratégie thérapeutique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, leur utilisation doit être adaptée aux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de *P. aeruginosa*.

La thèse se divise en trois parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique rappelant la prépondérance de *P. aeruginosa* dans un grand nombre d'infections humaines et l'importance des  $\beta$ -lactamines dans le traitement de telles infections. Après un rappel des caractéristiques structurales et du mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines et des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, un chapitre spécifique consacré aux  $\beta$ -lactamases résume les données actuelles sur l'activité des  $\beta$ -lactamases des différentes classes moléculaires chez *P. aeruginosa*.

Dans une seconde partie, seront présentées les méthodes qui ont été utilisées au laboratoire « antibiotiques antifongiques » pendant la période d'étude.

Enfin, la troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus qui portent principalement sur l'état actuel de la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* au niveau des différents services du C.H.U de Tlemcen . Enfin, les différents mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines existant chez *P. aeruginosa* et leur caractérisation seront exposés.



**PARTIE I**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.1 Habitat et pouvoir pathogène

*Pseudomonas aeruginosa*, espèce type du genre *Pseudomonas*, est un bacille à Gram négatif, mobile par flagelle polaire, aérobic strict ubiquitaire, produisant un pigment bleu-vert appelé pyocyanine, spécifique de *P. aeruginosa*, et un pigment jaune-vert fluorescent, appelé pyoverdine, commun à d'autres espèces. Le réservoir naturel de cette bactérie saprophyte est l'eau, les végétaux au contact de cette eau et les sols humides (Murray et al., 1999). Peu abondant sur la peau et les muqueuses de l'homme, *P. aeruginosa* leur est apporté par les aliments, expliquant qu'il soit trouvé à faible concentration dans le tube digestif de 4 à 12% des individus sains (Bodey et al., 1983), ne constituant donc qu'une espèce mineure de la flore intestinale. La présence prolongée ou en abondance de *P. aeruginosa* dans la flore digestive résulte généralement d'une antibiothérapie sélective. *P. aeruginosa* se comporte comme un agent pathogène opportuniste essentiellement, mais non exclusivement, chez les patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose. *P. aeruginosa* est alors responsable d'infections très polymorphes dans leur expression et d'autant plus graves qu'il possède de nombreux facteurs de virulence et qu'il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques et antiseptiques. Une des raisons pour lesquelles *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste efficace réside dans la grande variété de ses facteurs de virulence, parmi lesquels nous distinguerons ceux impliqués dans la colonisation (Tang et al., 1995), ceux impliqués dans l'invasion et la survie de la bactérie (Lazdunski, 1998) et ceux responsables de lésions tissulaires (Woods et Vasil, 1994).

### 1.2. Incidence clinique

Parmi les différentes bactéries responsables d'infections chez l'homme, *P. aeruginosa* représente une espèce particulière. Ceci est lié en grande partie à la multiplicité de ses facteurs de virulence, que nous venons d'énoncer, ou encore à sa résistance particulière à de nombreux antibiotiques, mais également aux nombreuses formes

d'expression que peut prendre une telle infection. Ses exigences nutritives modestes et la nécessité d'un environnement humide et modérément chaud pour sa multiplication, font, de tous les réservoirs d'eau, des sources potentielles de bacille souvent à l'origine d'infections, particulièrement en milieu hospitalier ( éviers, siphons, solutions aqueuses d'antiseptiques...)(Salyer et Witt, 2002). La source secondaire de contamination est le malade colonisé ou infecté lui même, principalement par ses exsudats ( plaies infectées, crachats, urines...). La transmission peut donc se faire soit à partir d'un réservoir, soit de malade à malade par l'intermédiaire du personnel soignant (Sechér et *al.*,2005).

### **1.3.Traitement des infections à *P. aeruginosa***

Initialement appelé bacille pyocyanique ( du grec : *puon*, pus et du latin : *cyaneus*, bleu foncé) , *P. aeruginosa* fût isolé pour la première fois en médecine humaine en 1882, par le pharmacien des armées Gossard qui, à l'occasion de sa thèse, voulait en étudier le pigment (Avril et *al.*, 2000). A cette époque, l'apparition du « pus bleu chirurgical » était plutôt rassurante puisqu'il éloignait le spectre de la gangrène (Grimont,1998). Aujourd'hui, il n'est plus de même, et *P. aeruginosa* entraîne généralement de nombreux problèmes thérapeutiques. En effet, *P. aeruginosa* est redouté pour sa résistance naturelle à la plupart des antiseptiques utilisés en pratique hospitalière ainsi qu'à de nombreux antibiotiques. Par conséquent, un antibiogramme est nécessaire pour chaque souche responsable d'infection, afin d'adapter au mieux l'antibiothérapie. La nature nosocomiale de la plupart des infections à *P. aeruginosa* rend nécessaire une parfaite connaissance des mécanismes de transmission et des risques d'infection, dans le but d'éviter d'éventuelles diffusions d'épidémies. Néanmoins, l'une des règles admises dans le traitement de ces infections est d'utiliser une association incluant une  $\beta$ -lactamine et un autre antibiotique, le plus souvent aminoside ou quinolone (Nordmann, 2003). Cette association permet de diviser par trois le risque de sélection de mutants résistants (Bedos, 2003).

## 2. $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

### 2.1. Généralités. Historique

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules (Tableau 1), toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame (Figures 1 et 2) indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associées à un mode d'action fort complexe sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) ou penicillin binding proteins (Cavallo, 2004).

Bien que la pénicilline ait été réellement découverte en 1896 par un jeune médecin, Ernest Duchesne (Prescott *et al.*, 1995), on considère que l'histoire des  $\beta$ -lactamines a réellement commencé trente ans plus tard avec l'observation d'Alexander Fleming en 1929, qui remarqua qu'une souche de *Penicillium* produisait un agent diffusible capable d'inhiber la croissance bactérienne. Il appela cet agent pénicilline. Ce n'est en fait, qu'au début de la seconde guerre mondiale, que l'activité chimiothérapeutique de la pénicilline fut démontrée (Chain *et al.*, 1940). L'introduction de la pénicilline en pratique clinique entraîna alors la découverte de beaucoup d'autres antibiotiques durant les années 1940-1950 (streptomycine, chloramphénicol, kanamycine...). Les molécules disponibles appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines se limitaient alors à la pénicilline G (benzylpénicilline) et à la pénicilline V (phénoxy méthylpénicilline).

Il faudra attendre le début des années 1960 pour que l'isolement naturel du noyau pénicilline ou péname ou encore acide 6-amino-pénicillanique (6-APA) par Batchelor *et al.* (1959) permette de réaliser la synthèse des pénicillines semi-synthétiques (ampicilline, cloxacilline ...), d'une part, et pour que la coupure artificielle de la chaîne latérale de la céphalosporine C, libérant le noyau céphalosporine ou céphème ou encore acide 7-amino-céphalosporanique (7-ACA) permette la synthèse des céphalosporines semi-synthétiques, d'autre part (Morin *et coll.*, 1962) (figures 1, 2 et 3). Ces deux découvertes majeures marquent le réel point de départ de l'histoire des  $\beta$ -lactamines. La découverte des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, tels que l'acide clavulanique, eut lieu une quinzaine d'années plus tard (Brown *et al.*, 1976). L'origine de la plupart des  $\beta$ -lactamines est donc naturelle. Elles sont principalement synthétisées par trois genres de champignons filamenteux : *Penicillium* (pénicilline

G), *Streptomyces clavuligerus* (céphamycine C et acide clavulanique) et *S. cattleya* (imipénème) et *Cephalosporium* (céphalosporine C) ( Medeiros,1997).

**Tableau 1. Classification des  $\beta$ -lactamines (groupes et sous-groupes) et principales Molécules (Doublet,2004) .**

Groupe	Sous-groupe	Principales molécules
<b>Pénicillines</b>	Pénicilline G	Benzylpénicilline, Phénoxygénicilline
	Pénicilline M	Oxacilline, Cloxacilline
	Pénicilline A	Ampicilline, Amoxicilline
	Acyl-uréido-pénicilline	Pipéracilline, Ticarcilline
	Amido-pénicilline	Pivmécillinam
	Inhibiteurs des $\beta$ -lactamases	Acide clavulanique, Sulbactam
<b>Céphalosporines</b>	Première génération (C1G)	Céfalexine, Céfalotine
	Deuxième génération (C2G)	Céfoxitine, Céfamandole
	Troisième génération (C3G)	Céfotaxime, Céfopérazone, Ceftriaxone, Céftiofur
	Quatrième génération (C4G)	Céfépime, Césiprome
<b>Carbapénèmes</b>		Imipénème
<b>Monobactames</b>		Aztréonam

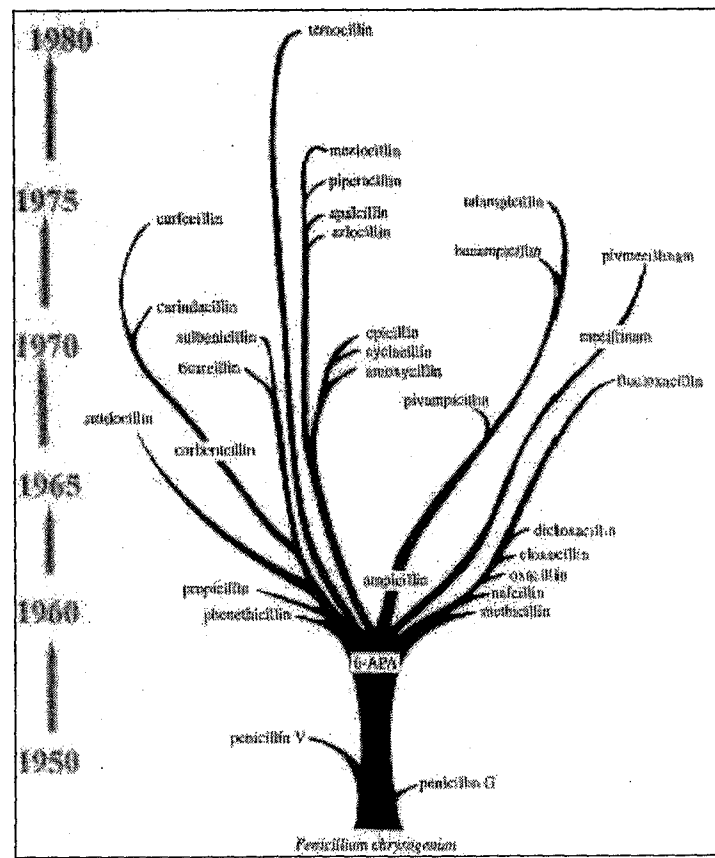


Fig 1 . Développement des pénicillines semi-synthétiques( Rolinson,1998).

## 2.2. Classification des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature du noyau entrant dans leur structure de base (Smith et al.,2001 ). La structure du noyau de base, qui comporte toujours le cycle  $\beta$ -lactame, permet de répartir ces produits en trois grands groupes : les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique, les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et les monobactames.

### 2.2.1. Dérivés de l'acide-6-amino-pénicillanique.

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines. Il intègre le grand groupe des  $\beta$ -lactamines ayant un noyau péname, caractéristique des pénicillines, parmi lesquelles il y a lieu de distinguer au moins sept

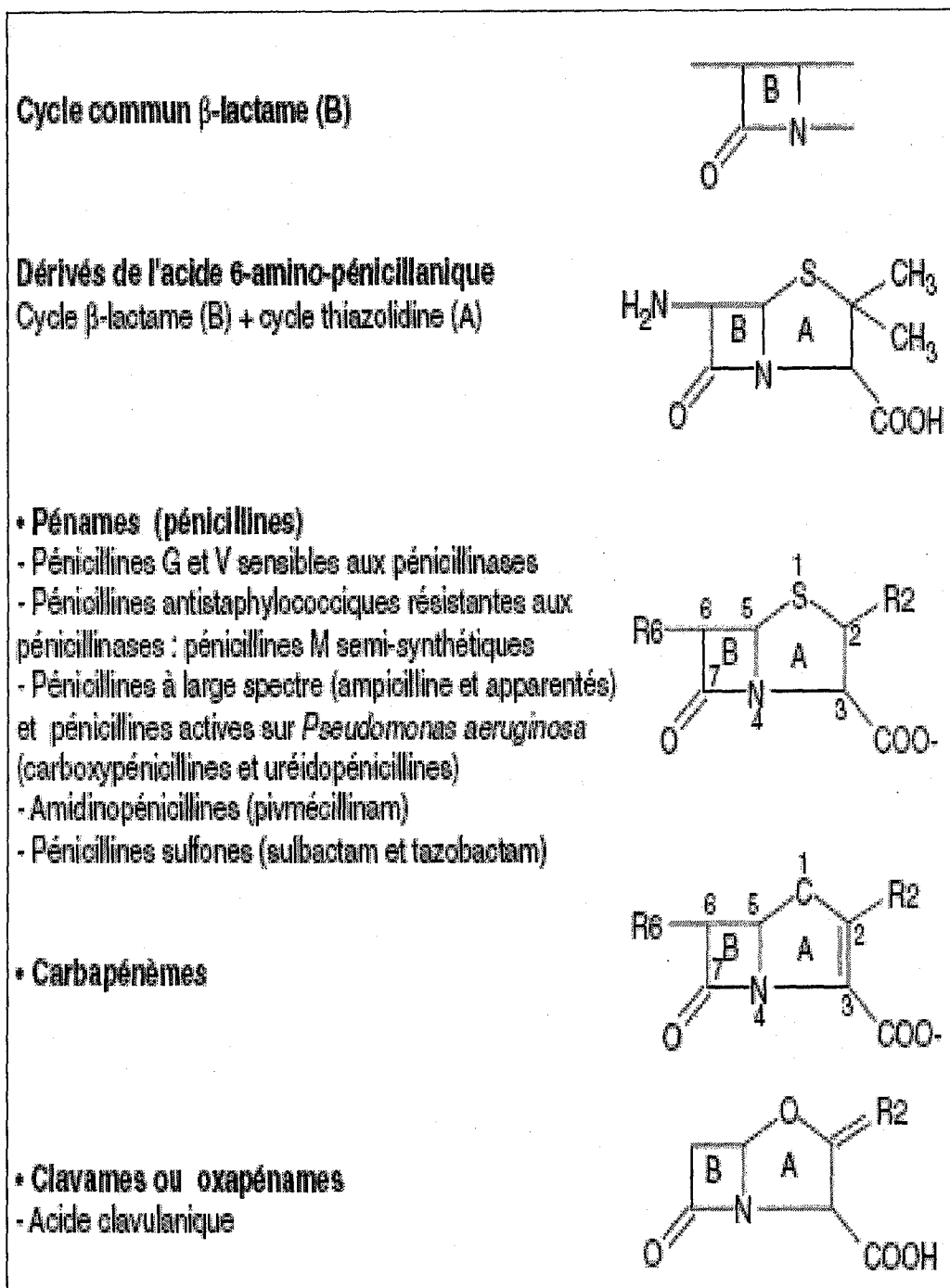


Figure 2. Classification des  $\beta$ -lactamines: dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (Cavallo et al., 2004).

sous-groupes différenciés par leur structure chimique, leur stabilité, leur spectre et leur activité antibactérienne. Ce sont (**figure 2**):

les phénoxy pénicillines et analogues de la pénicilline G, la méthicilline et les isoxazoly pénicillines, les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les acyluréidopénicillines, les amidinopénicillines, les pénicillines sulfonées et les méthoxycarboxypénicillines.

D'autres  $\beta$ -lactamines ont un noyau qui dérive du noyau pénème par substitution du soufre en position 1 :

- La substitution du soufre en position 1 du noyau pénème par un oxygène est à l'origine du noyau clavame ; l'acide clavulanique est la seule molécule naturelle actuellement commercialisée dans ce groupe ;
- La substitution du soufre en position 1 du noyau pénème par un atome de carbone est à l'origine du noyau pénème ; les carbapénèmes les plus connus sont l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème (Cavallo, 2004).

### 2.2.2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique .

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou 7-ACA (noyau céphème), qui distingue les céphalosporines des pénicillines. Suivant les substituants en R3 et R4, on distingue les céphalosporines, les céphamycines et les oxacéphèmes (**figure 3**). La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables.



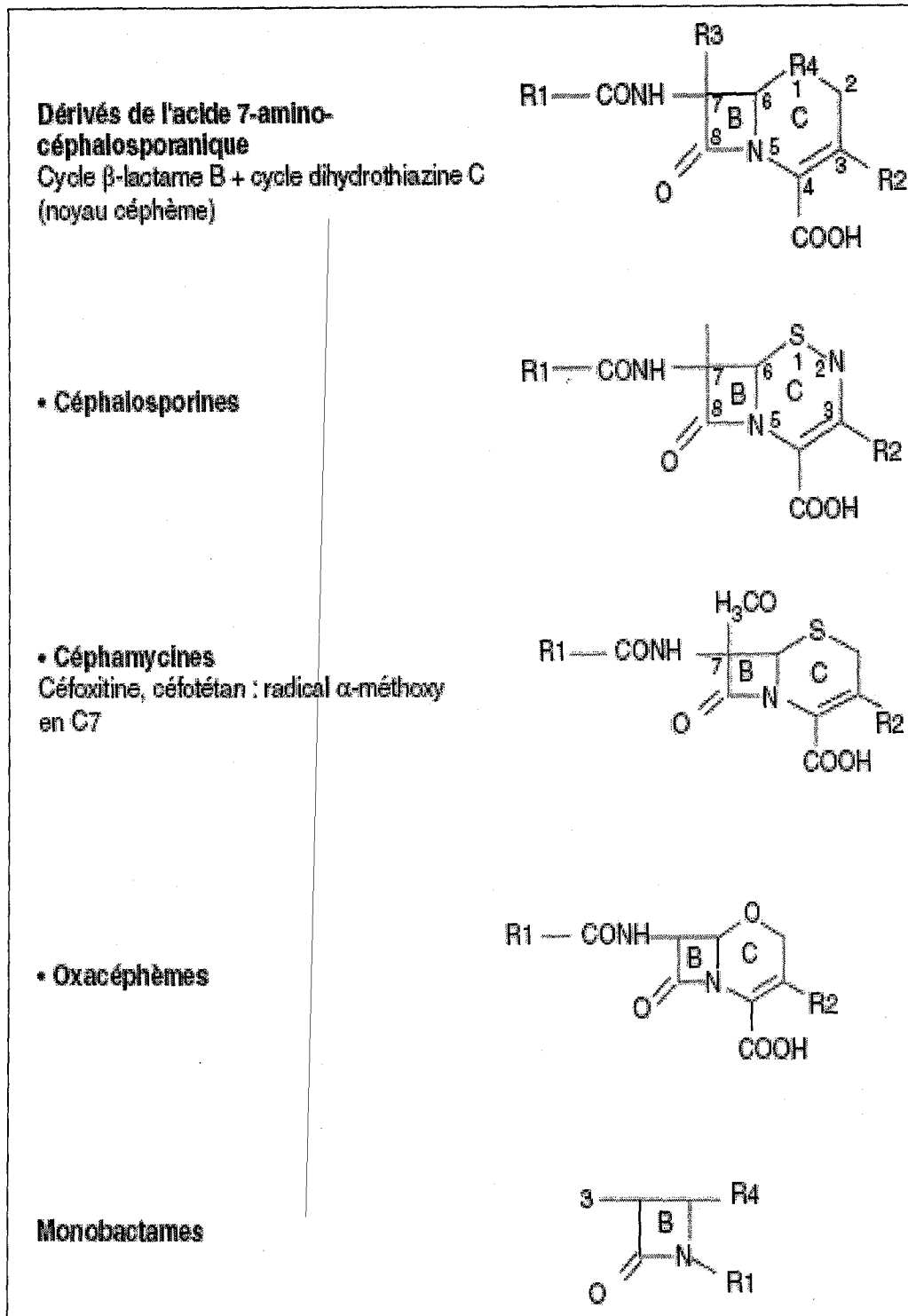


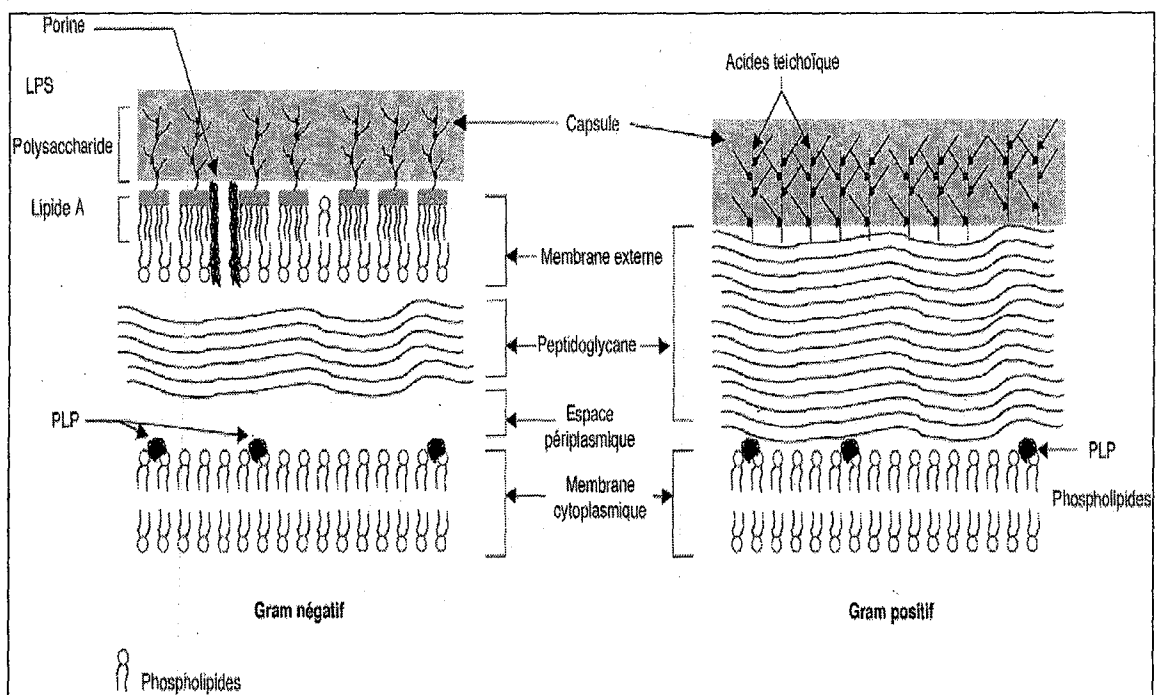
Figure 3. Classification des  $\beta$ -lactamines:dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames(Cavallo et al., 2004)

### 2.2.3. Monobactames .

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle  $\beta$ -lactame (figure 3). Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit (Le Noc,1999).

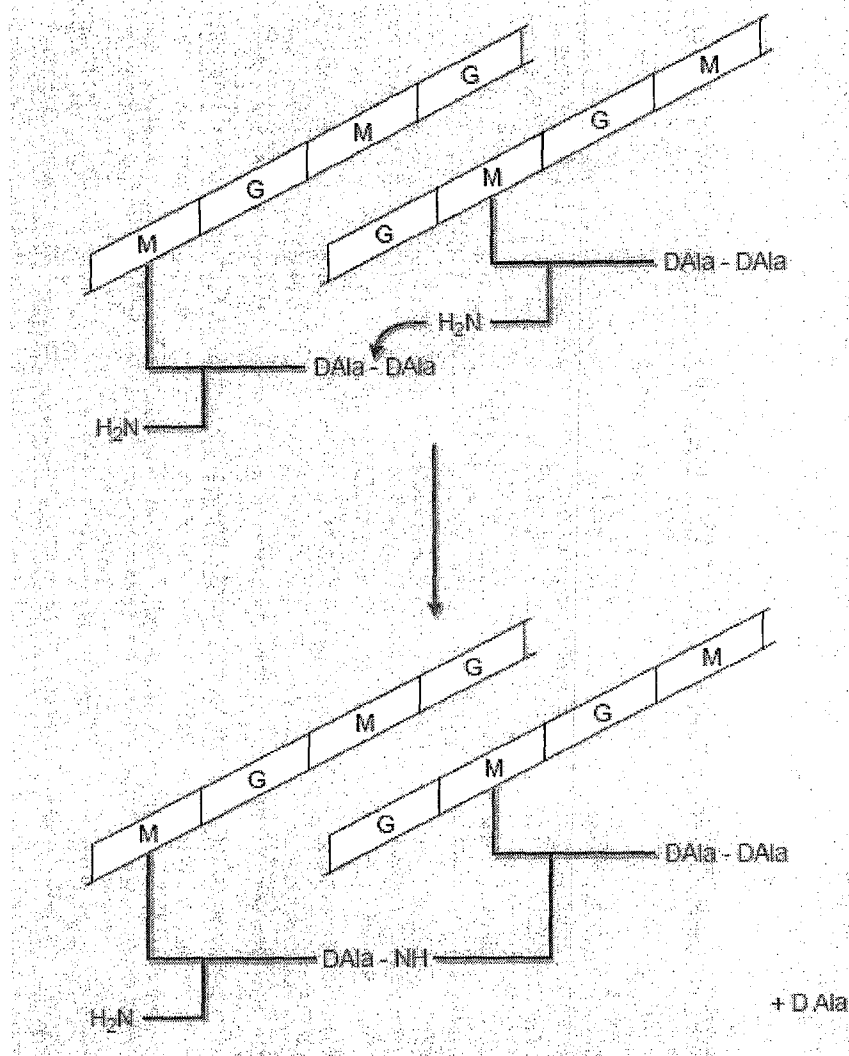
### 2.3. Mode d'action des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont des agents bactéricides qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Elles interviennent dans la dernière étape du processus d'élaboration de l'un des éléments essentiels de la paroi : le peptidoglycane (figure 4 et 5) (Charlier et *al.*,1998); en effet, le peptidoglycane est un polymère glycoprotéique dont le précurseur est constitué d'un motif associant de la N-acétyl glucosamine (GlcNAc) à de l'acide N-acétyl muramique (MurNAc), sur lequel est branché un pentapeptide comprenant de la L-alanine (L-Ala), de l'acide D-glutamique ( D-Glu), de la L-lysine (L-Lys) dans les bactéries à Gram positif ou de l'acide *mésodiaminopimélique* (DAP) chez les bactéries à Gram négatif, et deux résidus D-alanine (D-Ala).



**Figure 4. Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.**

LPS : lipopolysaccharide ; PLP :protéines de liaison aux pénicillines.



**Figure 5. Fermeture des ponts peptidiques du peptidoglycane**  
(Charlier et al., 1998).

Les chaînes saccharidiques sont en noir (G : N-acétylglucosamine ; M : acide N-acétylmuramique) et la partie peptidique en rouge. La partie saccharidique est synthétisée par ajout des unités disaccharide -peptide liées au transporteur lipidique. La réaction de transpeptidation décrite ci-dessus est catalysée par une DD-peptidase habituellement sensible à la pénicilline. Elle a pour résultat la formation de ponts peptidiques entre les chaînes saccharidiques, ce qui assure la résistance mécanique du polymère.

L'arrangement tridimensionnel du peptidoglycane se fait par liaison entre la L-Lys ou le DAP du pentapeptide d'un chaînon peptidique et l'avant-dernier D-Ala d'un autre chaînon avec relargage du D-Ala terminal (**Figure 5**). Cette réaction, appelée transpeptidation, est catalysée par des transpeptidases et des carboxypeptidases (Frère et Joris, 1985 ; Tankovic, 2000), qui sont des protéines généralement insérées dans la membrane cytoplasmique des bactéries par leur extrémité N-terminale et dont le site actif est orienté vers l'espace périplasmique. Ces enzymes sont la cible principale des  $\beta$ -lactamines, c'est pourquoi elles sont également appelées protéines liant la pénicilline (PLP) ou « penicillin-binding proteins » (PBP). Les  $\beta$ -lactamines se fixent sur ces enzymes par analogie de structure entre le noyau  $\beta$ -lactame et le dipeptide D-Ala-D-Ala, et inactivent ces enzymes suite à l'acylation de leur sérine active par le cycle  $\beta$ -lactame. Cette inactivation serait suivie d'une dépression des inhibiteurs des autolysines bactériennes, entraînant ainsi la lyse de la cellule.

Plusieurs PLPs sont présentes en nombre variable (3 à plus de 8) dans chaque espèce bactérienne, et les  $\beta$ -lactamines se fixent à ces protéines avec des affinités différentes (Fisher et al., 2005). Les PLPs de haut poids moléculaire sont généralement des enzymes bi-fonctionnelles (transpeptidases et transglycosylases), tandis que l'activité des PBPs à bas poids moléculaire est souvent limitée à une seule fonction DD-peptidase (DD-transpeptidase ou DD-carboxypeptidase) (Nguyen-Distèche et al., 1998). Dans le cas particulier de *P. aeruginosa*, sept PLPs ont été décrites : les PLPs de haut poids moléculaire 1a, 1b, 2 et 3, et les PLPs de bas poids moléculaire 4, 5, 6 (Curtis et al., 1979 ; Nagushi et al., 1979). Plus tard, une PLP de bas poids moléculaire supplémentaire a été décrite chez *P. aeruginosa* : la PLP7 (Song et al., 1998). La PLP2 semble être la cible spécifique des carbapénèmes, et plus particulièrement de l'imipénème, tandis que le méropénème se fixe également aux PLPs 3 et 4 avec une bonne affinité (Yang et al., 1995). C'est également sur PLP3 que se fixent les principales  $\beta$ -lactamines actives sur *P. aeruginosa* telles que la cefsulodine, la ceftazidime, la pipéracilline et la ticarcilline, et avec une très bonne affinité par opposition à la PLP4 (Neu et Scully, 1984 ; Gotoh et al., 1990), ainsi que les céphalosporines les plus récentes (céfépime et cefpirome) (Pucci et al., 1991). La PLP3 est fréquemment impliquée par mutations ponctuelles dans la résistance acquise

de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines (Godfrey et al. , 1981 ; Gotoh et al. ,1990). Par ailleurs, ce sont vraisemblablement ces protéines qui, dans le processus naturel de l'évolution, ont donné naissance aux différentes  $\beta$ -lactamases (Galleni et al. , 1995 ; Massova et Mobashery, 1998).

#### **2.4. Indications thérapeutiques des $\beta$ -lactamines**

La faible toxicité, la souplesse des dosages, la puissante activité bactéricide, ainsi que le coût modéré des  $\beta$ -lactamines (au moins pour la plupart d'entre elles), en font les antibiotiques les plus fréquemment prescrits dans le monde. Leurs indications thérapeutiques sont vastes et concernent la plupart des bactéries impliquées dans les infections humaines (Rodriguez-Villalobos et Struellens, 2006).

Les premières pénicillines (pénicilline G, méticilline et isoxazolympénicillines) étaient essentiellement actives contre les bactéries à Gram positif (staphylocoques et streptocoques). Aujourd'hui, elles restent des antibiotiques de choix pour le traitement des infections à cocci à Gram positif. On préfère souvent l'oxacilline à la méticilline, mieux tolérée par les patients souffrant d'affections rénales, et probablement moins toxique. Le spectre d'activité des aminopénicillines est étendu aux espèces de bactéries à Gram négatif ne produisant pas, à l'état naturel, de pénicillinase : *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* et *Shigella*. L'ampicilline et l'amoxicilline sont largement utilisées dans le monde entier, particulièrement pour le traitement des infections respiratoires chez l'enfant. L'amoxicilline diffère de l'ampicilline par sa meilleure absorption digestive. Enfin, les pénicillines à large spectre (carboxy- et uréidopénicillines) sont actives sur les bactéries anaérobies et sur un grand nombre de bacilles à Gram négatif aérobies qui produisent, à l'état naturel, une céphalosporinase. Les carboxypénicillines sont essentiellement employées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Pour renforcer leur activité (synergie), et pour éviter la sélection de mutants résistants, ces molécules sont généralement utilisées en association avec un aminoside dans les infections graves (Nordmann, 2003).

Les C1G sont actives (modérément) sur les bacilles à Gram négatif ne produisant pas de céphalosporinase inductible à l'état naturel (*E. coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp.*), et

sont très actives sur staphylocoques, même producteurs de pénicillinase plasmidique. Elles sont maintenant utilisées pour le traitement des infections à staphylocoque chez les patients allergiques aux pénicillines, et en chimioprophylaxie en chirurgie (céfazoline).

Les C2G possèdent un spectre d'activité plus large. Elles sont efficaces vis-à-vis de certains bacilles à Gram négatif naturellement résistants aux C1G : *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* et *Citobacter freundii*. Cas particulier parmi les C2G, la céfoxitine (céphamicyne) est caractérisée par son activité vis-à-vis de *Bacteroides fragilis* et sa très grande stabilité vis-à-vis des pénicillinases et des  $\beta$ LSE. Elle est généralement utilisée, en association avec un aminoside, dans le traitement des infections multiples dues à des germes aérobies et anaérobies. Il faut cependant préciser que les C2G ne sont pas actives sur *P. aeruginosa*.

Les C3G ont à peu près le même spectre d'activité que les pénicillines à spectre large pour ce qui est des bactéries aérobies à Gram négatif. Leur originalité réside dans le fait qu'elles sont très actives sur les bactéries aérobies à Gram négatif (CMI très basses), y compris celles produisant des pénicillinases plasmidiques. Le céfotaxime et la ceftriaxone sont les plus utilisées, la deuxième étant administrée une fois par jour grâce à sa longue demi-vie. Par la suite, la ceftazidime, la cefsulodine et la céfopérazone, et plus récemment le céfépime et le ceftirome, montrèrent une bonne activité sur *P. aeruginosa*. La ceftazidime est préférentiellement utilisée, souvent en association avec un aminoside ou avec la ciprofloxacine, dans les infections sévères à *P. aeruginosa*, dans le traitement des pneumopathies nosocomiales de réanimation et dans les poussées de surinfection bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose. Enfin, certaines C3G, telles que le céfixime et le ceftibuten, peuvent être administrées par voie orale, mais sont moins actives en raison des posologies peu élevées. L'émergence des  $\beta$ LSE et des souches hyperproductrices de céphalosporinase, conséquence d'antibiothérapies sélectives, remet sérieusement en cause l'utilisation des C3G, en particulier dans le traitement des infections nosocomiales dues à des bacilles à Gram négatif (Nauciel et Vildé, 2005).

L'aztréonam (monobactame) a un spectre d'activité unique limité aux bacilles aérobies à Gram négatif, et particulièrement aux entérobactéries et à *P. aeruginosa*. Il peut être

combiné avec d'autres agents antibactériens dans les infections mixtes à bacilles à Gram négatif aérobies et à bactéries anaérobies (clindamycine) ou à *cocci* à Gram positif (vancomycine) (Mouton et al., 2000).

L'imipénème (carbapénème) est l'antibiotique ayant le spectre d'activité le plus large parmi les  $\beta$ -lactamines. Il est aussi actif sur les staphylocoques et les streptocoques que les pénicillines, et la plupart des espèces de bactéries à Gram négatif y sont naturellement sensibles. De plus, à la différence de la plupart des pénicillines et des céphalosporines, l'imipénème possède une excellente activité vis-à-vis des bactéries anaérobies de type *Bacteroides*. L'imipénème conserve son activité face à la plupart des mécanismes acquis de résistance chez les bacilles à Gram négatif : pénicillinase,  $\beta$ LSE, hyperproduction de céphalosporinase. Il s'agit souvent d'un antibiotique de dernière intention dans le traitement des infections dues à des bacilles à Gram négatif multirésistants, ou dans le cas d'infections mixtes par des organismes aérobies et anaérobies. Il est co-administré avec la cilastatine, inhibiteur de la déhydropeptidase rénale, afin d'éviter sa dégradation *in vivo* par cette enzyme (Bryskier, 1999).

### 3. Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

*P. aeruginosa* est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques et par son aptitude à l'acquisition de nouvelles résistances vis-à-vis de composés habituellement actifs. Les principales familles d'antibiotiques présentant un intérêt thérapeutique sont les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Bert, 2000).

#### 3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

*P. aeruginosa* dispose pour contrer l'efficacité des  $\beta$ -lactamines d'une quinzaine de systèmes connus à ce jour (Chen et al., 1993 ; Rio et al., 2002)

L'activité d'une  $\beta$ -lactamine est la résultante de sa pénétration à travers la paroi bactérienne, de l'affinité pour sa cible et de sa capacité à résister à l'hydrolyse par d'éventuelles  $\beta$ -lactamases. Parmi les mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines, nous distinguerons ici ceux appartenant à la résistance naturelle de ceux appartenant à la résistance acquise.

### 3.1.1. Résistance naturelle.

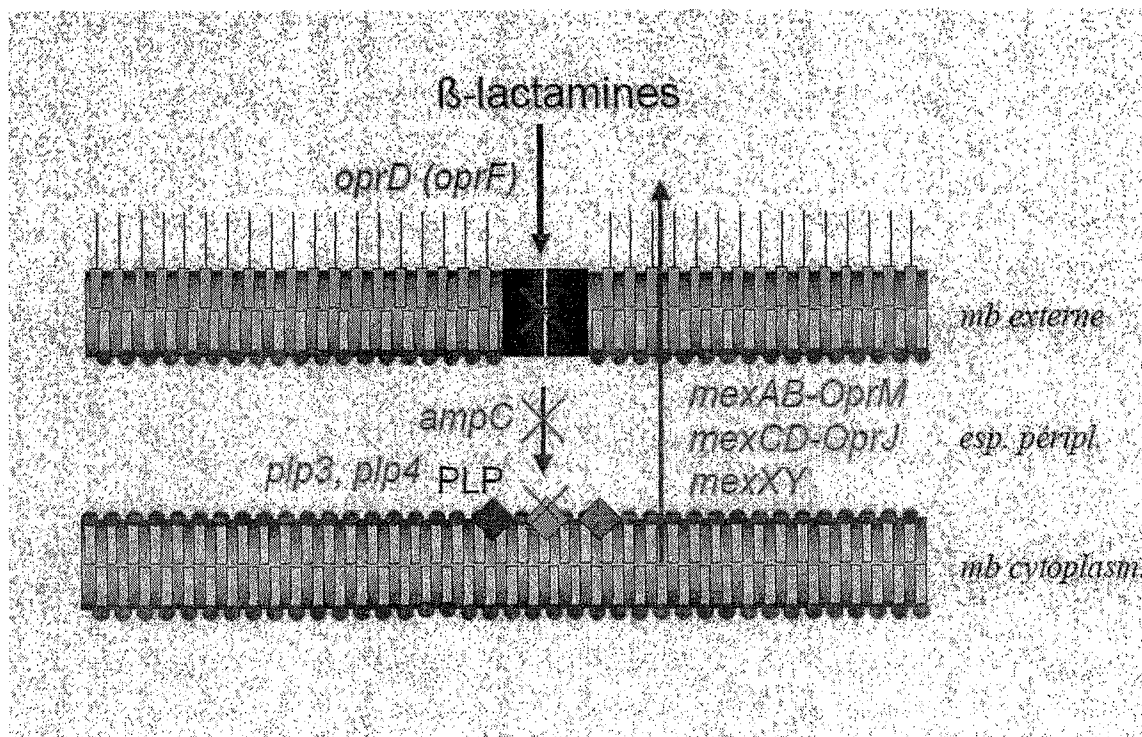
*P.aeruginosa* est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques (à certaines  $\beta$ -lactamines, mais également aux glycopeptides, macrolides, tétracyclines, acide nalidixique, chloramphénicol et triméthoprime). Les mécanismes participant à cette résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines sont au nombre de trois, fréquemment regroupés sous l'appellation de « résistance intrinsèque » de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines : l'imperméabilité relative de la membrane externe, la présence de systèmes d'efflux actif et la production d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique de classe C spécifique de cette espèce bactérienne.

#### 3.1.1.1 Imperméabilité de la paroi.

La structure de la paroi de *P. aeruginosa* est semblable à celle de toute autre bactérie à Gram négatif (Figure 4), mis à part les exopolysaccharides existant dans les souches de phénotype « mucoïde » responsables de la dégradation de l'état général des patients atteints de mucoviscidose. La membrane externe est donc constituée d'une bicouche phospholipidique, dont le feuillet externe est majoritairement constitué de lipopolysaccharides (LPS ou endotoxine) (Figure 4), portant à son extrémité O polysaccharidique (partie hydrophile) la spécificité antigénique O de la bactérie. Outre ces sucres localisés dans la partie la plus externe du LPS, on trouve également un composant interne ancré dans la membrane (partie hydrophobe), le lipide A (diglucosamine phosphate associé à cinq à sept acides gras), lui-même lié à une partie intermédiaire, le core, composé de huit à douze sucres variables et comprenant un octasaccharide chargé négativement (2-céto-3-déoxyoctanate) (Hancock, 1997). Ainsi, le core fait du LPS une surface externe polyanionique, dont la forte charge négative est partiellement neutralisée par la présence de cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ). C'est en entrant en compétition avec ces cations, et en les délocalisant, que certains antibiotiques chargés positivement (tels que les aminosides) peuvent interagir directement avec le LPS et se frayer un chemin vers l'espace périplasmique (Figure 5). Ce n'est cependant pas le cas des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles pour lesquelles il a été montré que la perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* était 10 à 100 fois plus faible que celle de *E.coli* (Yoshimura et Nikaido, 1982 ; Nakae, 1995).



Ceci est la conséquence des propriétés particulières de certaines protéines de la paroi de *P. aeruginosa* : les porines, initialement appelées 'OMP' pour 'outer membrane proteins' (Nikaido et al. , 1991), et du fait que cette espèce bactérienne possède un nombre peu élevé de ces protéines dans sa membrane externe (Satake et al. , 1991). Or, les porines sont des canaux hydrophiles transmembranaires (Figure 5 ), permettant le passage sélectif de petites substances hydrophiles à travers la membrane externe, vers l'espace périplasmique comme vers le milieu extérieur. Elles représentent donc la voie de passage privilégiée des  $\beta$ -lactamines (ainsi que des fluoroquinolones hydrophiles). Les  $\beta$ -lactamines pénétrant le plus facilement la membrane externe de *P. aeruginosa* sont les monoanions (pipéracilline), les zwitterions (ceftazidime, imipénème) et celles portant deux charges négatives (cefsulodine, aztréonam). Plusieurs porines ont été décrites chez *P. aeruginosa* : C, D1, D2, E, F, G, H et I et la caractérisation de la diffusion de plusieurs  $\beta$ -lactamines à travers certaines d'entre elles a été étudiée (Satake et al. , 1990 ; Trias et Nikaido, 1990a). Généralement, les porines semblent fournir des voies de diffusion non spécifiques. Cependant, leur nombre et leur limite d'exclusion sont autant de facteurs limitants. C'est ainsi que les grosses molécules anioniques, telles que la ceftazidime ou l'aztréonam, diffusent plus facilement à travers la porine C, alors que l'imipénème utilise de façon préférentielle la porine D2 (Trias et Nikaido, 1990b), désormais nommée OprD, probablement grâce à l'analogie de structure existant entre les acides aminés basiques et la chaîne latérale de l'imipénème.



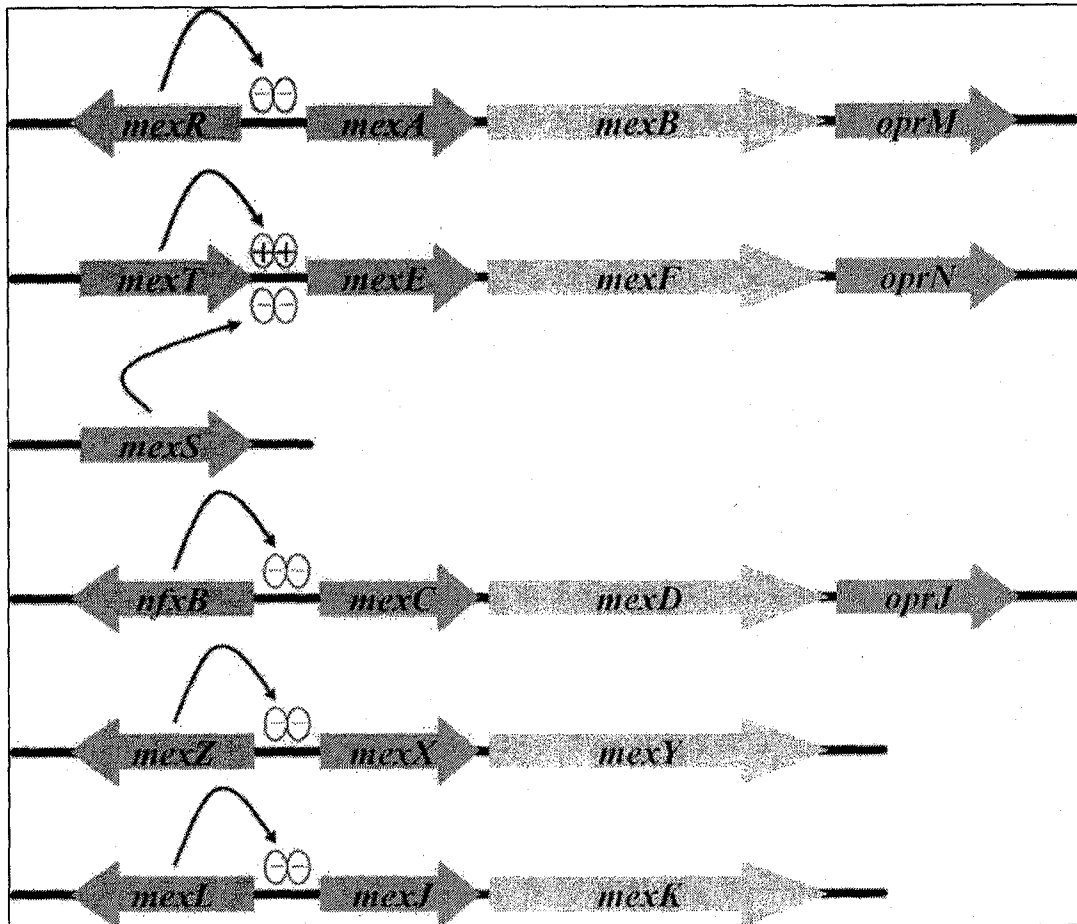
**Figure 5. Structure schématique de la paroi de *P. aeruginosa* et des différents systèmes impliqués dans la résistance de cette bactérie aux β-lactamines (Plésiat, 1998)**

### 3.1.1.2. Systèmes d'efflux actif.

Contrairement à ce qui était admis depuis longtemps, la résistance intrinsèque de *P.aeruginosa* aux β-lactamines ne peut être imputée uniquement à la faible perméabilité de sa membrane externe. En effet, il a été récemment montré que des systèmes naturels d'efflux actifs (leur fonctionnement est inhibé par des agents découplants tels que le cyanure de *m*-chlorophényl ou CCCP) sont insérés dans la paroi et permettent à *P.aeruginosa* d'expulser des antibiotiques appartenant à plusieurs familles, dont les β-lactamines (Li et al. , 1994). Outre cette fonction, il semblerait que ces systèmes soient également impliqués dans le rejet des produits du métabolisme vers le milieu extérieur (Poole, 1994). Ces systèmes d'efflux

existent donc dans la plupart des espèces bactériennes, tel que le régulon *mar* (multiple antibiotic resistance) décrit chez *E. coli* (Alkshun et Levy, 1997), mais leur action est particulièrement renforcée chez *P. aeruginosa* par la faible diffusion des antibiotiques à travers la membrane externe. A ce jour, trois systèmes d'efflux sont bien caractérisés chez *P. aeruginosa* : MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ et MexE-MexF-OprN (Poole et al., 1993 ; Li et al., 1995 ; Poole et al., 1996 ; Koehler et al., 1997), l'opéron MexA-MexB-OprM étant le premier à avoir été caractérisé, et celui pour lequel le plus grand nombre d'informations est disponible dans la littérature (Hocquet, 2004 ; Cattoir, 2004). Chacun de ces systèmes est constitué par une association protéique tripartite comprenant : une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de transporteur pour un ensemble de molécules à caractère amphiphile (pompe à H<sup>+</sup> : MexB, MexD ou MexF), une protéine de membrane externe (OprM, OprJ ou OprN) à travers le canal de laquelle les molécules initialement captées par la pompe seront expulsées vers le milieu extracellulaire, et une protéine périplasmique dite "de fusion membranaire" (MexA, MexC ou MexE) reliant les deux autres composants du système (Figure 5). La pompe tire son énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique : l'expulsion d'une molécule d'antibiotique est donc couplée à l'entrée d'un proton dans le cytoplasme. Le site exact de la prise en charge de la molécule à exporter par la pompe demeure cependant inconnu. De plus, il semblerait que pour chaque système d'efflux, ce soit la pompe qui soit le composant majeur et déterminant d'une certaine spécificité de substrat du système, notamment concernant les β-lactamines. Ceci a pu être démontré par l'observation que la surexpression de OprM seule modifiait peu le phénotype de résistance d'une souche sauvage de *P. aeruginosa* et, par conséquent, n'était pas seule responsable de l'efflux (Wong et al., 1997), ainsi que par la construction de pompes chimériques MexAB-OprJ et MexCD-OprM (Srikumar et al., 1997) et l'expression individuelle de chacun des composants des systèmes MexAB-OprM et MexCD-OprJ dans une souche d'*E. coli* déficiente en système d'efflux (Srikumar et al., 1998). Il faut cependant préciser ici qu'il a été très récemment démontré que la protéine OprM seule était capable d'expulser des antibiotiques et contribuait, à elle seule, à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* de par sa capacité d'efflux actif indépendante de

MexAB (Zhao et al., 1998). Les détails de la spécificité de substrat de ces trois systèmes, concernant les  $\beta$ -lactamines, seront abordés dans un paragraphe du chapitre suivant traitant de la résistance acquise de *P.aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines par surexpression des systèmes d'efflux. On peut cependant noter dès à présent que trois antibiotiques semblent être des substrats privilégiés de ces pompes : la tétracycline, le chloramphénicol et la norfloxacine (Nikaido, 1996 ; Li et al. , 1994). Au niveau génétique, ces trois systèmes sont codés par trois opérons distincts situés à des endroits différents sur le chromosome de *P. aeruginosa* , mais présentant une organisation comparable dans laquelle l'unité transcriptionnelle comprenant les gènes de structure de chaque composant se trouve sous le contrôle d'un régulateur (Poole et al. , 1996 ; Koehler et al. , 1997) (Figure 6). Ce sont des gènes régulateurs qui, sous l'effet de mutations, sont responsables de la surexpression des systèmes d'efflux, comme nous pourrons le voir dans le chapitre suivant. Parmi ces trois systèmes, seul le système MexAB-OprM contribue à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* (Poole et al. , 1993). De plus il est le seul système exprimé de façon constitutive chez cette bactérie, les deux autres étant réprimés chez les souches sauvages (Poole et al. , 1996 ; Koehler et al. , 1997 ; Gotoh et al. , 1994). Ce système d'efflux actif fonctionnant en permanence explique donc en grande partie la résistance intrinsèque du bacille pyocyanique à de nombreux agents anti-bactériens dont certaines  $\beta$ - lactamines, mais il ne faut cependant pas oublier que celle-ci résulte également du faible nombre de molécules d'antibiotiques ayant pu franchir la paroi de la bactérie via les porines, et de l'hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase périplasmique codée par le chromosome de cette espèce (Piddock, 2006).



**Figure 6. Organisation génétique des opérons *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexJK* et *mexXY* avec leurs régulateurs transcriptionnels chez *P.aeruginosa* (Cattoir, 2004).**

Chaque opéron contient les gènes encodant les trois protéines du système (pompe RND, MFP et porine) sauf *mexJK* et *mexXY* dont les produits s'associent avec la porine OprM. Chaque opéron est contrôlé au niveau local par un répresseur (-) ou un activateur (+) dont le gène est situé en amont. À noter que la transcription de l'opéron *mexEF-oprN* est aussi contrôlée par un répresseur dont le gène est situé à distance sur le chromosome.

### 3.1.1.3. La céphalosporinase chromosomique de *P. aeruginosa* : $\beta$ -lactamase de classe C

*P. aeruginosa* comme *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ou encore *Serratia marscecens*, possède une  $\beta$ -lactamase chromosomique typique de l'espèce dont l'existence est connue depuis plus de trente ans (Sabath *et al.*, 1965). Cette enzyme, souvent appelée "céphalosporinase chromosomique" de par la spécificité de son spectre de substrat, appartient à la classe moléculaire C de Ambler (Ambler *et al.*, 1991), déterminée par la présence de trois éléments de structure primaire conservés. Elle est codée par le gène *ampC* (Lodge *et al.*, 1990), existant également chez la plupart des entérobactéries, dont l'expression est régulée par au moins quatre gènes : *ampR*, *ampG*, *ampD* et *ampE*. Un modèle a été proposé pour tenter d'expliquer la régulation de l'expression du gène *ampC* chez les entérobactéries (Jacobs *et al.*, 1994) (Figure 7), et il est probable que ce modèle puisse également s'appliquer à *P. aeruginosa*, même si certains éléments de ce système de régulation semblent différents chez cette espèce. Produite à un niveau basal, cette enzyme participe à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (Campbell, 1997). En effet, cette enzyme est normalement produite à bas niveau du fait de l'action limitée de AmpR activateur de la transcription de *ampC* réprimé dans des conditions normales, mais sa production est également inductible par la présence de certaines  $\beta$ -lactamines, telle que la céfotaxine (Sykes et Matthew, 1976). Dans les conditions d'induction, AmpR agit comme un activateur fort car il est déréprimé. La résistance touche alors l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, à l'exception des oxyiminocéphalosporines les plus récentes (céfépime et cefpirome) et des carbapénèmes (imipénème et méropénème). Cependant, l'induction est un phénomène temporaire réversible, contrairement à l'hyperproduction constitutive que nous détaillerons dans le chapitre suivant. Par ailleurs, il faut rappeler ici que l'activité de ce type de  $\beta$ -lactamases n'est pas inhibée par l'acide clavulanique.

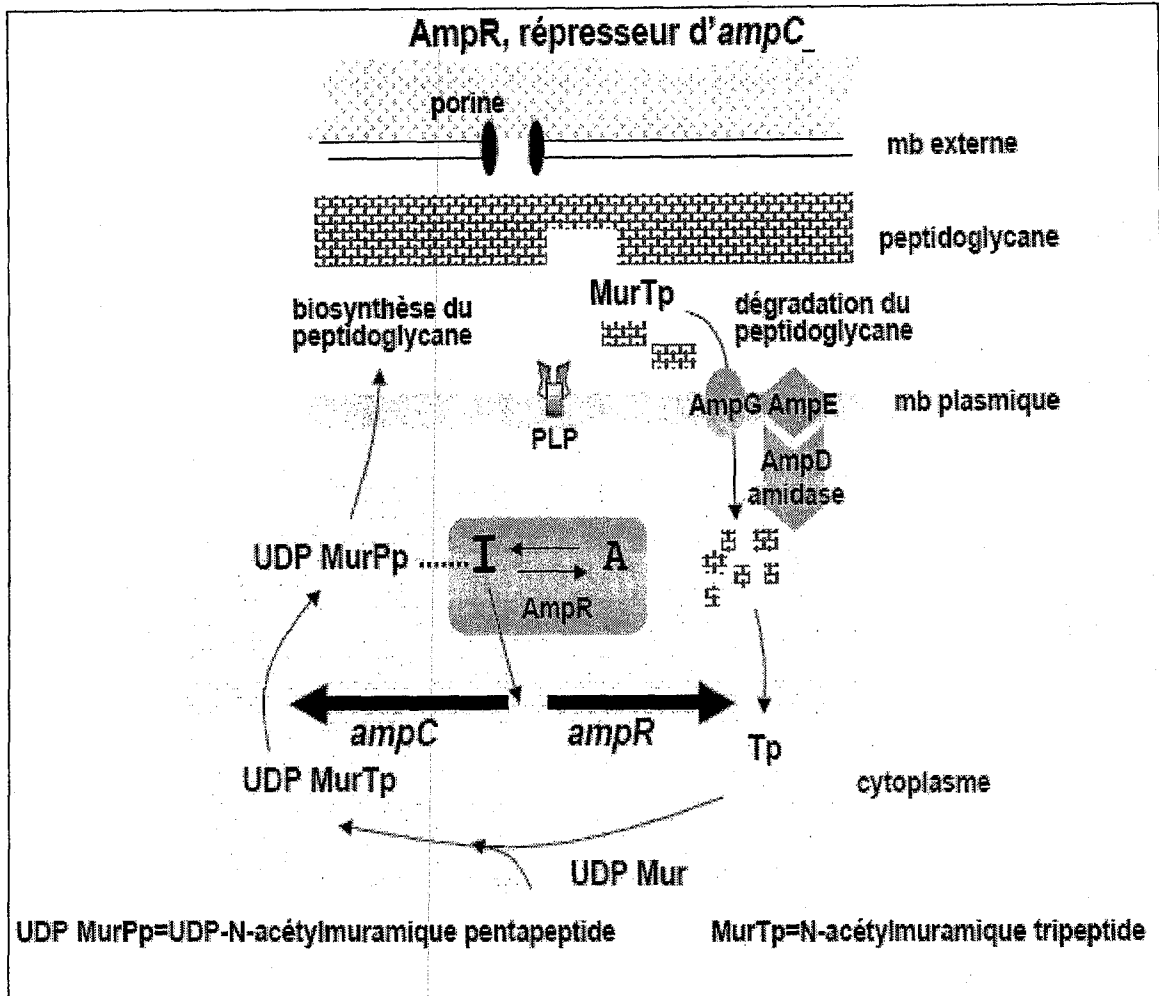


Figure 7. Modèle représentant la bactérie dans les conditions normales et faisant apparaître les différents gènes impliqués dans le recyclage du peptidoglycane et l'induction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique AmpC chez les entérobactéries (Meideiros, 1997)

### 3.1.2. Résistance acquise.

Nous venons de voir que *P. aeruginosa* était naturellement résistant à de nombreux antibiotiques. Outre cette résistance intrinsèque, *P. aeruginosa* est également capable de développer un certain nombre de stratégies pour acquérir des moyens de résistance renforcés ou supplémentaires afin de faire face aux agressions que représentent les antibiothérapies. Les principaux mécanismes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines (figure 8) et leur expression phénotypique sont résumés dans le tableau 2. Ils peuvent être divisés en mécanismes de nature enzymatique et de nature non enzymatique.

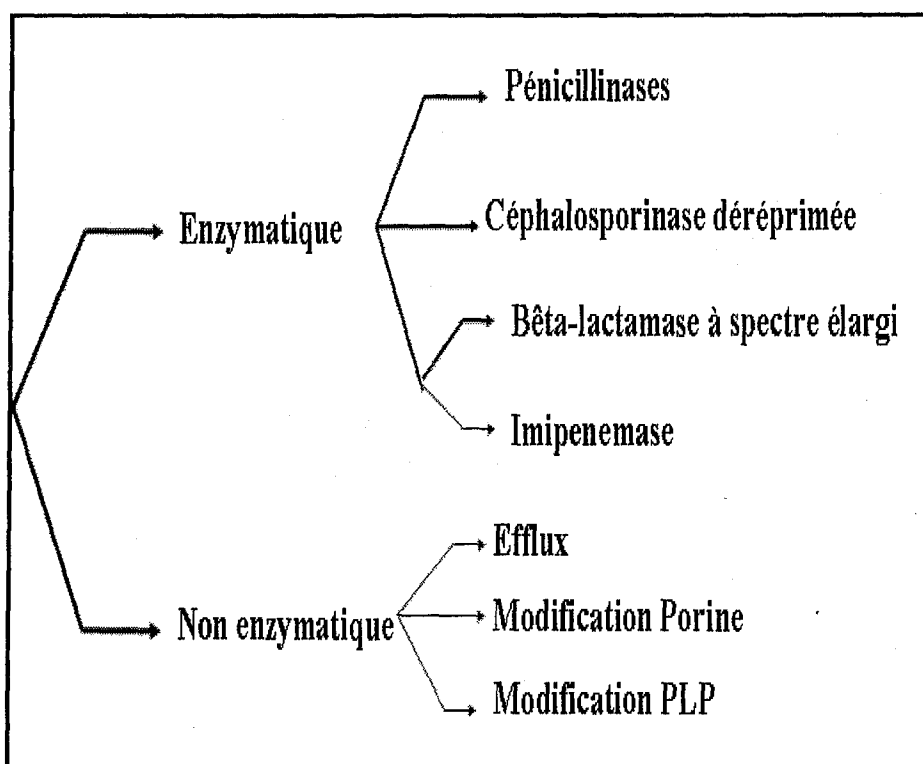


Figure 8. Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines (Ruimy, 2003)



**Tableau 2. Principaux mécanismes de résistance vis-à-vis des antibiotiques recommandés pour le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* (Mesaros,2007).**

Antibiotiques	Mécanismes						
	Diminution de l'accumulation		Enzymes inactivants			Modification de la cible	
	Perte de OprD	Efflux actif	β-lactamases	Enzymes modifiant les aminoglycosides*		Mutations Méthylation ribosomale	
	MexAB MexCD MexEF MexXY MexGH MexVW		Céphalosporinase (surexpression) Pénicillines à spectre étroit Oxacillines à spectre élargi β-lactamases à spectre élargi Métallo-β-lactamases	AAC(3)-I AAC(3)-II AAC(6')-I AAC(6')-II ANT(2)-I			
β-lactames							
Pénicillines	+	+	+	+	+	+	
Céphalosporines	+	+	(+)	(+)	+	+	
Aztréonam	+	+	+	(+)	+	+	
Imipénème	+					+	
Méropénème	(+)	+	+			+	
Aminoglycosides		+		GEN NET TOB	GEN NET TOB	GEN TOB	+
Fluoroquinolones	+	+	+	+	+	+	+

\* GEN : gentamicine ; NET : nétilmicine ; TOB : tobramcyine ; AMK: amikacine.

### 3.1.2.1. Résistance non enzymatique

A l'exception de la résistance isolée aux carbapénèmes par perte de la porine OprD, la résistance non enzymatique aux β-lactamines résulte d'un ensemble complexe de mécanismes. Il s'agit essentiellement de mécanismes d'efflux actifs et d'imperméabilité. Les résistances par modification du lipopolysaccharide ou perte d'affinité de la cible (PLP) sont très rares chez *P. aeruginosa*.

### a. Imperméabilité de la membrane externe : déficit en porine D<sub>2</sub>

L'exemple de la résistance de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines par modification des porines le plus connu est celui de l'acquisition de la résistance à l'imipénème par diminution de l'expression de la porine OprD (figure 9), anciennement dénommée D2 (Trias et al. , 1989 ; Trias et Nikaido, 1990b). Ce phénomène survient généralement suite à une antibiothérapie incluant l'imipénème, et durant laquelle des mutants de perméabilité sont sélectionnés (Quinn et al. , 1986). Un déficit en porine D<sub>2</sub>, associé à une hydrolyse partielle par la céphalosporinase AmpC, se traduit donc par une résistance isolée à l'imipénème (Livermore, 1992). Ce phénomène représente la principale cause de résistance à l'imipénème chez cette espèce (Pai, 2001). Il est alors impossible et inutile d'augmenter les doses d'imipénème, compte tenu de sa toxicité neurologique à forte dose. L'imipénème perd alors l'avantage qu'il possède sur les autres  $\beta$ -lactamines, i.e. la résistance à l'hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase chromosomique AmpC de *P. aeruginosa*. Il faut cependant noter ici qu'un autre carbapénème semble prometteur dans ce cas de figure puisqu'il possède les mêmes qualités que l'imipénème, mais pas de voie de passage préférentielle unique à travers la membrane externe de *P. aeruginosa* : il s'agit du méropénème. Ceci explique que la résistance par imperméabilité de *P. aeruginosa* à l'imipénème et au méropénème ne soit pas toujours croisée (Satake et al. , 1991 ; Poirel 2006)

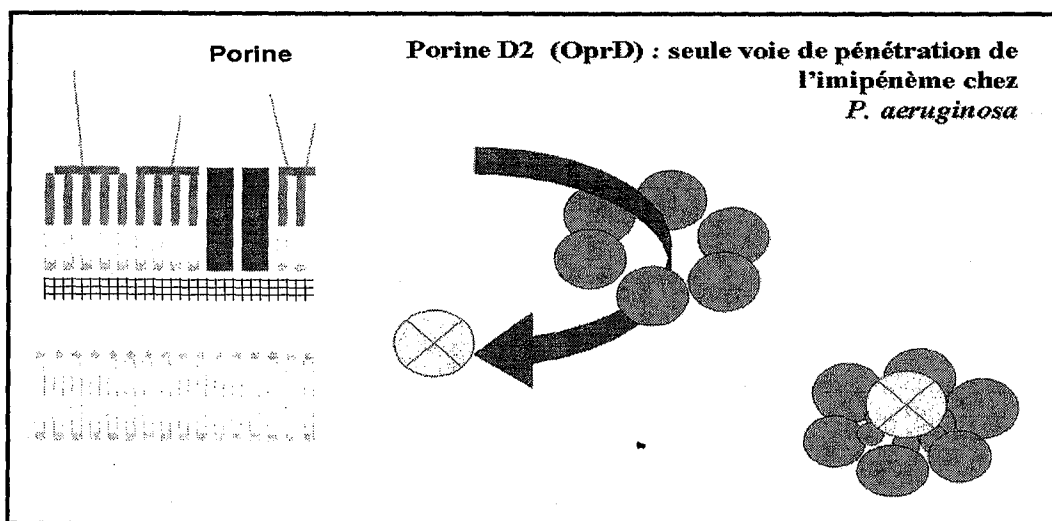


Figure 9. Modification de la perméabilité : porine D<sub>2</sub> (Aubert et Carricajo., 2005)

### b. Par surexpression d'un système d'efflux.

Sous l'effet de mutations sélectionnées suite à une antibiothérapie, les systèmes d'efflux actifs décrits dans le paragraphe 3.1.1.2 peuvent être surproduits, et entraîner une augmentation significative du niveau de résistance (CMI multipliées par un facteur 4 à 8) de *P. aeruginosa* à différents antibiotiques, dont les  $\beta$ -lactamines. Cependant, pour les trois systèmes d'efflux actifs décrits chez *P. aeruginosa*, les inducteurs naturels restent inconnus.

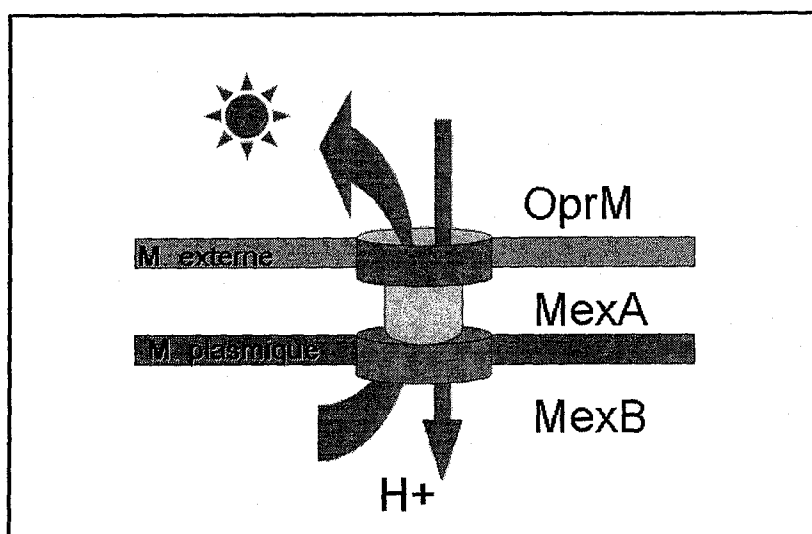


Figure 10 . Résistance par diminution de l'accumulation intrabactérienne (Aubert et Carricajo., 2005)

Plusieurs mutations ont été décrites comme étant à l'origine de la surexpression du système MexA-MexB-OprM (figure 10) : substitution d'acides aminés dans le répresseur MexR (Poole et al. , 1996) (Figure 6), protéine tronquée suite au décalage du cadre de lecture du gène *mexR* (Plésiat, 1998), ou mutations affectant d'autres gènes régulateurs n'appartenant pas à l'opéron MexAB-OprM, tels que *mexR* (également appelé *nalB*) ou *cfxB* codant pour des régulateurs transcriptionnels de l'opéron (Masuda et al. , 1995 ; Nikaido, 1998). La surexpression de ce système d'efflux se traduit alors par un profil de résistance particulier, lié à la surexpression de la protéine OprM (Wong et al., 1997), et le distinguant de la surproduction des deux autres systèmes d'efflux (MexCD-OprJ et MexEF-OprN) existant chez *P.aeruginosa*,

notamment par la résistance aux  $\beta$ -lactamines (carbénicilline), aux fluoroquinolones, au triméthoprim, au chloramphénicol, aux tétracyclines et à la novobiocine (Masuda et al. , 1995). La surexpression de ce système est le phénomène le plus important dans la résistance acquise liée à l'efflux, puisqu'il s'agit du seul système d'efflux actif produit de façon constitutive chez *P. aeruginosa*. De plus, MexAB-OprM est le système touchant le plus grand nombre de  $\beta$ -lactamines, y compris les associations  $\beta$ -lactamine-inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (Li et al. , 1998). Ce phénomène était en fait connu depuis de nombreuses années sous le terme de "résistance intrinsèque à la carbénicilline", bien que touchant d'autres antibiotiques que ce dernier.

L'expression des deux autres systèmes d'efflux (MexCD-OprJ et MexEF-OprN) est totalement réprimée à l'état normal. Néanmoins, l'expression peut également avoir lieu sous l'influence de diverses mutations au niveau des gènes régulateurs de la transcription *nfxB* (Poole et coll. , 1996a ; Masuda et coll. , 1996), *nfxC* (Masuda et coll. , 1995 ; Kohler et coll. , 1997) et *mexR* (Gotoh et coll. , 1998) des opérons *MexC-MexD-OprJ*, *MexE-MexF-OprN* et *mexA-mexB-OprM*, respectivement. Ces systèmes surproduits présentent également des spécificités de substrat : nouvelles céphalosporines (céfépime et ceftiofame), fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracyclines, et érythromycine pour MexCD-OprJ ; fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracyclines et imipénème pour MexEF-OprN. Toutefois, la résistance à l'imipénème liée à la surexpression de ce dernier système résulte, en fait, de la diminution de l'expression de la porine OprD (D2) observée dans de tels mutants (Masuda et al. , 1995).

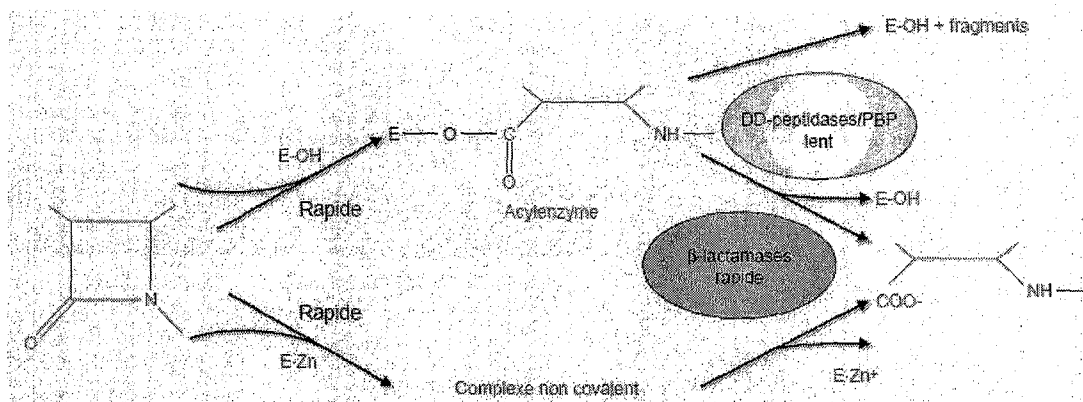
### c. Modification des PLPs

Très répandue et très étudiée chez les bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (Hakenbeck et Coyette, 1998 ; Ghuyssen, 1998), la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines par mutation ponctuelle ou disparition d'une PLP, entraînant une diminution d'affinité des  $\beta$ -lactamines pour leurs cibles, reste un phénomène relativement rare chez *P. aeruginosa*, bien qu'il ait été décrit pour les PLPs 3 et 4 chez quelques souches d'origine clinique hébergées par les patients atteints de mucoviscidose ou de pneumonie (Godfrey et al., 1981 ; Gotoh et al., 1990 ;

Bellido et al.,1990). Ce phénomène se caractérise par un haut niveau de résistance aux carboxy- et uréido-pénicillines indépendamment de la production de  $\beta$ -lactamases. Nous ne développerons pas davantage ce mécanisme de résistance acquise dont l'importance clinique, en terme de représentativité, reste à démontrer.

### 3.1.2.2. Résistance enzymatique

La résistance enzymatique représente le principal mécanisme de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (Philippon et Arlet, 2006). La grande diversité des enzymes d'inactivation des  $\beta$ -lactamines a suscité, depuis 1945, la publication d'articles visant à les classer (Labia,1999). Quatre majeures classifications ont été proposées (tableau 3) par Richmond et Sykes, Ambler, Mitsuhashi et Inoue, Bush-Jacoby et Meideros (Bush et al., 1995). Les diverses  $\beta$ -lactamases identifiées chez le bacille pyocyanique sont regroupées en quatre classes (A,B,C et D) dans la classification d'Ambler (Ambler,1980). Nous décrivons ici simplement les  $\beta$ -lactamases isolées chez *P. aeruginosa* et l'expression phénotypique des enzymes les plus fréquentes. Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame (figure 11), inactivant ainsi l'antibiotique. Ces enzymes sont sécrétées dans le milieu de culture ou dans le périplasme respectivement par les bactéries à Gram+ ou Gram-.

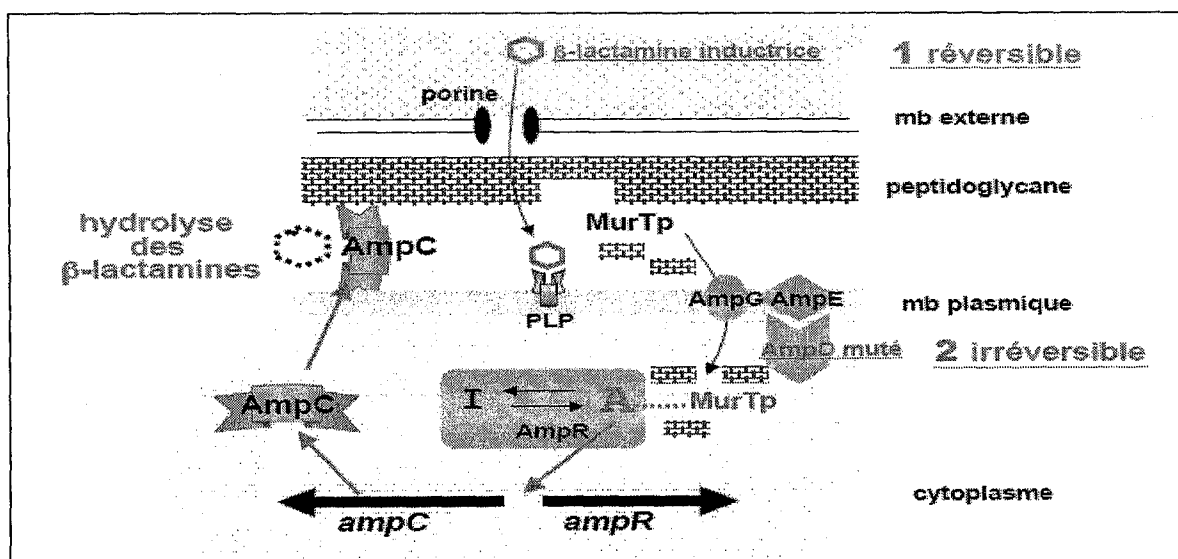


**Figure 11. Ouverture du noyau  $\beta$ -lactame par les DD-peptidases (E-OH) et les  $\beta$ -lactamases (E-OH ou E-Zn)(Charlier et al.,1998).**

Dans le cas des enzymes à sérine, la vitesse d'hydrolyse de l'acylenzyme détermine le type de phénomène : inactivation de l'enzyme (PBP) ou hydrolyse rapide de la  $\beta$ -lactamine ( $\beta$ -lactamases).

**a. Hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique**

La surexpression d'un gène codant pour une  $\beta$ -lactamase est l'un des moyens que peut développer la bactérie afin de résister aux  $\beta$ -lactamines (Chopra, 1998). Ce phénomène apparaît fréquemment, de façon consécutive à un traitement antibiotique incluant une  $\beta$ -lactamine qui est un mauvais inducteur (C3G). Il y a alors sélection de variants résistants devenus hyperproducteurs de la  $\beta$ -lactamase chromosomique de *P. aeruginosa*, et élimination des bactéries dans lesquelles la synthèse d'AmpC a été faiblement induite (Figure 12). Cette résistance à haut niveau touche l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, sauf le céfépime, le ceftiofime et les carbapénèmes (imipénème et méropénème), bien qu'un tel phénomène combiné à une perméabilité déficiente puisse entraîner la résistance à l'imipénème (Lee et al., 1991). L'existence d'une  $\beta$ -lactamase induite de type AmpC à déterminisme chromosomique (céphalosporinase) permet à l'espèce de développer une résistance efficace par surproduction constitutive de quantité très importante de  $\beta$ -lactamase jusqu'à 30000 fois celle de PAO1 (Livermore, 1995). La fréquence des mutants dérégulés augmente dans les situations à forte pression de sélection antibiotique, notamment en réanimation (jusqu'à 20%) (Bert, 1996 ; Rio, 2002) ou chez les patients atteints de mucoviscidose (Livermore, 1995).



**Figure 12. Production d'AmpC :  $\beta$ -lactamine inductrice ou mutation d'ampD (Doublet, 2004)**

Tableau 3 . Classification des  $\beta$ -lactamases bactériennes (Bush et al., 1995)

Bush-Jacoby-Meideros group	1989 Bush group	Richmond-Sykes class	Mitsubishi-Inoue type	Molecular class (Ambler)	Preffered substracts	Inhibited by:		Representative enzymes
						CA	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	-	-	AmpC enzymes from Gram negative bacteria ; MIR
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	-	Penicillinases from Gram positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, Cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillin, Narrow spectrum and extended spectrum cephalosporins, monobactams	+	-	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebssiella oxytoca</i> K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	+/-	-	TEM-30 to TEM 36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, Carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, Cloxacillin	+/-	-	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2°	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	-	Inductibles cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	-	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i>
3	3	Not included	Not included	B	Most $\beta$ -lactam, including carbapenems	-	+	L1 from <i>Xanthomonas maltophila</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Not included	Not included	ND	Penicillins	-	?	Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>

CSase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase.

CA, clavulanic acid

Nd, not determined

**b. Pénicillinases acquises**

Outre les différents mécanismes de résistance acquise que nous venons d'aborder, *P. aeruginosa* peut également acquérir différentes  $\beta$ -lactamases grâce à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons ou intégrons). Trois groupes de  $\beta$ -lactamases responsables de phénotypes de résistance différents ont été identifiés. Il s'agit de carbénicillinases (groupe CARB ou PSE), d'oxacillinases (OXA) ou de pénicillinases du groupe TEM (Figure 13). Ces pénicillinases à spectre restreint confèrent une résistance à la ticarcilline, la piperacilline, la cefsulodine mais pas à la ceftazidime ni à l'imipénème (Cavallo et al., 2000a).

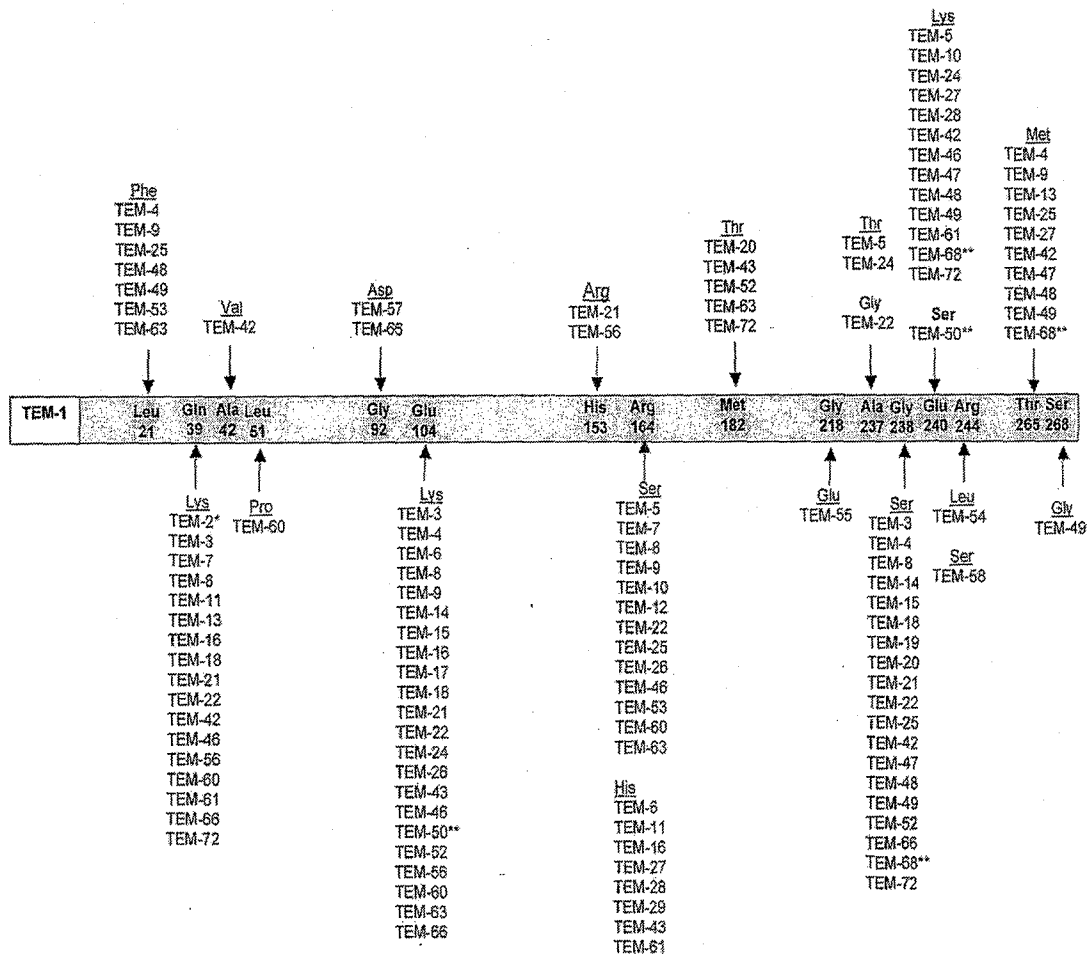


Figure 13. La famille des TEM (Bradford, 2001).



### c. $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Il s'agit de  $\beta$ -lactamases acquises capables d'hydrolyser les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (Weldhagen, 2003). A l'exception des enzymes de la famille OXA, elles sont sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases et confèrent à la bactérie une résistance à de nombreuses  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes (Bradford, 2001). La première BLSE identifiée chez *P. aeruginosa* était PER-1, isolée chez un patient originaire de Turquie (Nordmann, 1993). D'autres enzymes ont été décrites par la suite chez cette espèce. Certaines dérivent, par substitution d'un ou plusieurs acides aminés, de  $\beta$ -lactamases classiques du groupe OXA, TEM ou SHV (par exemple OXA-14 dérivé d'OXA 10) alors que d'autres sont d'origine inconnue (Philippon et al., 1997). Les gènes codant pour les BLSE sont le plus souvent situés au sein d'intégrons comportant une série de gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, en particulier aux aminosides, ce qui explique la multirésistance observée chez ces souches. (Lévesque et al., 1995).

### d. Carbapénémases

Ce sont des métallo-enzymes, capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Elles sont de type IMP ou VIM. La première carbapénémase identifiée était IMP-1 décrite pour la première fois au Japon en 1991 (Watanabe, 1991). Comme pour les BLSE, le support génétique de ces enzymes est situé au sein d'intégrons en position plasmidique ou chromosomique. Ces enzymes sont redoutables car elles induisent une résistance de haut niveau à toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception de l'aztréonam (Nordmann, 2003). Fait aggravant, il s'y associe une résistance croisée constante aux aminosides. Le risque de dissémination mondiale de ces carbapénémases chez les bacilles à Gram négatif représente un problème préoccupant. (Kurokawa et coll, 1999). De plus, leur fréquence est très probablement sous estimée en raison des difficultés de détection (Nordmann, 2002).

## 3.2. Résistance aux aminosides

*P. aeruginosa* présente une résistance naturelle à la kanamycine mais est habituellement sensible aux autres aminosides (gentamicine, tobramycine, nétilmicine,

amikacine). Les mécanismes de résistance acquise peuvent être classés en deux catégories (Bert,2002) :

- mécanismes de nature enzymatique : il s'agit de la production d'enzymes capables d'inactiver les aminosides par acétylation (aminoacétyltransférases (AAC)), nucléotidylation (nucléotidyltransférases) ou phosphorylation (phosphotransférases). De nombreuses enzymes ont été décrites, le phénotype de résistance observée étant variable selon le type d'enzyme. La plus fréquente, l'AAC(6')-II, confère une résistance à la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine mais pas l'amikacine. Le support génétique de ces enzymes est souvent situé au sein d'intégrons comportant aussi un ou des gènes codant pour une  $\beta$ -lactamase ;
- mécanismes de nature non enzymatique : il s'agit d'une perturbation de transport actif de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, se traduisant par une résistance de bas niveau à l'ensemble des aminosides. Plus récemment, un système d'efflux actif désigné MexXY, affectant les aminosides et d'autres familles d'antibiotiques, a été identifié (Ramos et *al.*,1999).

Comme pour les  $\beta$ -lactamines, l'incidence de la résistance acquise est variable selon les services et le type de patient. L'amikacine est l'aminoside demeurant le plus souvent actif, avec 70% de sensibilité pour l'ensemble des souches, mais seulement 33% pour les souches isolées de mucoviscidose (Cavallo et *al.*,2000b).

### 3.3. Résistance aux quinolones

Parmi les quinolones, seules les fluoroquinolones sont efficaces vis-à-vis de *P. aeruginosa*, la ciprofloxacine étant de loin la molécule la plus active. Les mécanismes de résistance acquise sont au moins de trois (Yoshida et *al.*,1994 ;Cambau et *al.*,1995) :

- modification d'affinité de la cible : les quinolones agissent en inhibant des enzymes impliquées dans la répllication de l'ADN bactérien, l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Certaines mutations pouvant survenir au niveau des

protéines *gyrA* et *gyrB* ( sous unités A et B de l'ADN gyrase) ou de la sous unité *parC* de la topo-isomérase entraînent une baisse de l'affinité pour l'antibiotique. Le niveau de résistance observé est variable selon le nombre et la localisation de ces mutations ;

- diminution de la pénétration de l'antibiotique , à la suite de modifications au niveau des porines ou du polysaccharide ;
- efflux actif : les différents systèmes d'efflux actif précédemment cités pour les  $\beta$ -lactamines et les aminosides confèrent tous une résistance de bas niveau aux quinolones (Plésiat et *al.*,1998).

**Partie II**

**MATERIEL ET METHODES**

## **1. Matériel**

### **1.1 Souches de références et plasmides utilisés**

ATCC 27853 (*P. aeruginosa* de phénotype sauvage)

ATCC 25922 (*E.coli*)

PU 21 Cipro R (*P. aeruginosa* résistant à la ciprofloxacine)

VP517(Kieser, 1984)

pBR 322 et pRK 2013

### **1.2. Milieux de Culture**

#### **1.2.1. Milieux de culture liquides**

Bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur d'Algérie)

Bouillon Cœur cerveau (BHIB) (Fluka)

Bouillon Luria (LB) (Sigma)

#### **1.2.2. Milieux de culture solides (Fluka)**

Gélose nutritive

Mac Conkey

Mueller Hinton.

### **1.3. Tests biochimiques**

Galerie API 20 NE (Bio Mérieux)

Disques d'oxydase (Fluka)

### **1.4. Solutions et Tampons (Annexes 5, 6 et 7)**

Tampon phosphate 0,5 M pH 7

Solution iodo-iodurée

Tampon TE

Solution de lyse

Phénol-Chloroform-Isoamylalcool (24 : 25 :1) (Sigma)

Tampon TBE 1X

Tampon de charge

Solution de BET (Sigma)

## 1.5. Antibiotiques

### 1.5.1. En disque (Bio - Rad)

Ticarcilline (75 µg), Ticarcilline + Acide Clavulanique (75/10 µg), Pipéracilline (75), Pipéracilline + Tazobactam (75/10 µg), Imipénème (10 µg), Aztréonam (30 µg), Céfotaxime (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Céfopérazone (30 µg), Cefsulodine (30 µg), Céfépime (30 µg), Moxalactam (30 µg), Tobramycine (10 µg), Amikacine (30 µg), Gentamicine (15 µg) et Ciprofloxacine (5 µg).

### 1.5.2. En poudre

Ticarcilline (Glaxo Smith Kline), Ticarcilline + Acide Clavulanique (Glaxo Smith Kline), Pipéracilline (Dakota<sup>R</sup> Pharm), Pipéracilline + Tazobactam (Wyeth Pharmaceuticals), Cloxacilline (astellas), Imipénème (MSD), Aztréonam (Sanofi-Synthelabo), Céfotaxime (Aventis), Ceftazidime (Glaxo Smith Kline), Céfépime (Bristol-Myers Squibb), Tobramycine (Merck), Amikacine (Bristol-Myers Squibb), Gentamicine (Panpharma) et Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

## 2. Méthodes

### 2.1 Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage sur des plaies post-opératoires infectées, puis acheminés au laboratoire pour être incubés 18 à 24 heures dans du bouillon nutritif.

### 2.2. Souches bactériennes

#### 2.2.1. Isolement et Identification

L'isolement est réalisé sur gélose nutritive supplémentée de 0,02% de cétrimide (Sigma) et incubé 48 heures à 37° C (Crespo et al., 2004). Les colonies présentant une pigmentation verte ou rose sont repiquées sur le même milieu pendant 48 heures à 37° C puis sur Mac Conkey pendant 24 heures à 42° C.

L'identification a été réalisée par Galerie API 20NE et test de l'oxydase (Marchal et al., 1987).

La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 1), et l'identification obtenue à l'aide du tableau d'identification du catalogue analytique (Annexe 2).

#### 2.2.2. Sérotypage

Le sérotype représente le marqueur phénotypique le plus couramment utilisé pour *Pseudomonas aeruginosa*. Il est basé sur les propriétés antigéniques lipopolysaccharides (LPS) membranaires.

Le sérotypage est réalisé sur des cultures pures et récentes de *P. aeruginosa* sur milieu de Mueller Hinton gélosé par la réaction d'agglutination sur lame.

Les réactifs (Bio-Rad, Marnes -la-Coquette, France) utilisés sont les antisérums polyvalents (Pm A,C,E,F) et monovalents (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Une souche est dite agglutinable lorsqu'elle est positive avec l'un des quatre antisérums.

### **2.2.3. Extraction de l'ADN plasmidique (Kado et Liu., 1981 – modifiée)**

#### **2.2.3.1. Principe**

Cette technique repose sur la lyse bactérienne par un traitement par du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) alcalin combiné à la chaleur suivie d'une élimination des contaminants majeurs (protéines, ADN chromosomique, ARN de haut poids moléculaire) par des solvants organiques.

#### **2.2.3.2. Technique**

- Réaliser une culture bactérienne dans 5 ml de LB et incuber 24 heures à 37° C
- Centrifuger 3 ml de culture à 12000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante
- Jeter le surnageant et sécher le culot
- Ajouter 100 µl de TE. Bien vortexer
- Ajouter 200 µl de solution de lyse
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Incuber à 55° C pendant 30 minutes. Agiter de temps à autre
- Ajouter 600 µl (2 volumes) de phénol-chloroforme-isoamylalcool (24 : 25 : 1)
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois
- Centrifuger à 12000 rpm pendant 15 mn
- Récupérer délicatement la phase supérieure dans un nouveau microtube.

### **2.2.4 Electrophorèse d'ADN plasmidique (Sambrook et Russel., 2001)**

#### **2.2.4.1. Principe**

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des molécules chargées selon leur taille respective. Sous l'application d'un champ électrique, les acides nucléiques étant chargés négativement, vont migrer vers l'anode plus ou moins rapidement en fonction de leur poids moléculaire.



#### **2.2.4.2. Technique**

##### **Préparation du gel d'agarose**

- Pour un gel de 0,8%, dissoudre par chauffage jusqu'à ébullition, 1,6 g d'agarose (Sigma) dans 200 ml de tampon TBE 1X
- Refroidir la solution à 55° C dans un bain Marie, puis couler le gel dans un moule dont les 2 extrémités ont été préalablement fermées par du ruban adhésif
- Déposer un peigne dans le gel afin de réaliser les puits
- Laisser solidifier
- Retirer le peigne du gel et le ruban adhésif du moule
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse
- Ajouter un volume de tampon TBE 1X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1 mm au dessus).

##### **Ensemencement**

- Répartir dans des tubes eppendorfs 20 µl de chaque solution d'ADN
- Ajouter 5 µl de tampon de charge
- Mélanger à l'aide d'une micropipette puis transférer les 25 µl des mélanges dans les puits du gel.

##### **Migration**

Brancher le générateur après avoir raccordé la cuve. Appliquer un voltage de 90 volts pendant 4 heures.

##### **Révélation**

Colorer le gel en l'immergeant dans une solution de TBE 1X contenant du BET à une concentration de 0,5 µg/ml pendant 30 à 45 minutes à température ambiante.

#### **2.2.5. Amplification aléatoire, technique RAPD**

Les isolats produisant des β-lactamases transférables ont été génotypés par Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), qui est une méthode d'amplification par PCR utilisant une amorce non spécifique s'hybridant de façon aléatoire sur le chromosome

de la bactérie. L'analyse des profils de migration permet de comparer l'identité génétique des souches.

L'ADN génomique a été extrait à partir de 100µl de culture par chauffage à 100°C pendant 10mn suivi immédiatement d'un refroidissement en glace pendant 10mn. L'échantillon a été ensuite centrifugé 10mn à 4°C et le surnageant a été délicatement transféré dans un autre tube. Un aliquote de 5µl du surnageant a servi pour la réaction de PCR (annexe 8), en utilisant les amorces 272 (5'-AGC GGC CCA A-3') et AP5 (5'-TCC CGC TGC G-3'), tel que déjà décrit (Mahenthiralingam et al., 1996 ; Talon et al., 1998). L'amplification est réalisée à l'aide du Biofidal (Vaulx -en- Velin, France) PCR system dans un thermocycler Omnigene (Hybaid, Teddington), dans les conditions suivantes : : 94°C pendant 4mn, puis 35 cycles : :94°C 30sec, 36°C 30sec, 72°C 1mn, et un cycle final de 3mn à 72° C.

Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v) dans un tampon Tris borate EDTA 0,5X. Les profils obtenus sont comparés entre eux, les souches présentant un profil similaire sont considérées comme identiques.

### **3. Etude de la résistance aux antibiotiques**

#### **3.1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI en milieu gélosé)**

##### **3.1.1. Principe**

La méthode de dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

##### **3.1.2 Technique**

###### **Préparation des solutions d'antibiotiques**

Pour chacun des antibiotiques, préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions sériées de progression géométrique de raison 1/2 (**Annexe 4**).

### **Préparation des boîtes**

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri ainsi que 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin.
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton gélosé maintenu en surfusion
- Bien mélanger et laisser solidifier
- Sécher les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37° C.

### **Préparation de L'inoculum**

Préparer des suspensions de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester.

### **Ensemencement**

- Diluer la suspension inoculum au 1/10
- Ensemencer par spot 1 à 2  $\mu$ l de la suspension bactérienne, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

### **Incubation**

Incuber 18 à 24 heures à 37° C.

#### **3.1.3. Lecture**

- S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin
- La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

## **3.2. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines**

### **3.2.1. AntibioGramme (CASFM 2006 ; Vedel 2005)**

#### **3.2.1.1. Principe**

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistant) et d'orienter le traitement antibiotique. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

### 3.2.1.2. Technique

#### Préparation de L'inoculum

- Pour chacune des souches à tester, réaliser une suspension en ensemencant 5 ml de bouillon BHIB par 3 à 4 colonies de morphologie similaire à partir d'un milieu non sélectif
- Incuber 3 à 5 heures sous agitation à 37° C. La culture obtenue doit être de  $10^8$  UFC/ml soit de densité optique 0,08 – 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm.

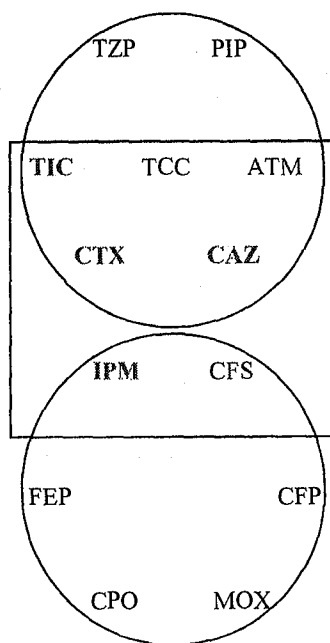
#### Ensemencement

- Diluer la suspension inoculum au 1/100 ( $\approx 10^6$  UFC/ml) dans de l'eau physiologique
- Ensemencer par inondation, en respectant les mesures de sécurité nécessaires, les boîtes de Pétri préalablement coulées par 20 ml de milieu Mueller Hinton
- Rejeter l'excès puis sécher les boîtes 20 à 30 minutes à l'étuve.

#### Application des disques

- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile.

Pour ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines, placer les disques dans un ordre qui obéit au schéma de Vedel (Figure 14).



Principaux marqueurs	Marqueurs secondaires	Liste complémentaire
TIC : Ticarcilline CTX : Céfotaxime CAZ : Ceftazidime IPM : Imipénème	TCC : Ticarcilline + ac. clavulanique ATM : Aztréonam CFS : Cefsulodine	TZP : Pipéracilline + tazobactam PIP : Pipéracilline FEP : Céfépime CFP : Céfopérazone CPO : Cefpirome MOX : Moxalactam

Figure 14 . Schéma de Vedel (2005)

### 3.2.1.3 Lecture

- Après 18 à 24 heures d'incubation, mesurer les diamètres d'inhibition et se référer aux valeurs critiques (**Annexe 3**)
- Interpréter les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

### 3.2.2. Test iodométrique (Courvalin et *al.*, 1985)

#### 3.2.2.1. Principe

Il consiste en une décoloration du complexe iode-amidon due à la réduction de l'iode par l'acide pénicilloïque issu de l'hydrolyse de la pénicilline G par les  $\beta$ -lactamases.

#### 3.2.2.2. Technique

##### Préparation du gel

- Dissoudre, par chauffage jusqu'à ébullition, 0,3 g d'amidon et 0,8 g d'agarose dans 50 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7
- Refroidir la solution au bain Marie à une température de 55° C
- Ajouter 1,2 ml de solution iodo-iodurée et 30 mg de Pénicilline G
- Bien mélanger, verser dans des boîtes de Pétri puis laisser solidifier
- Réaliser des puits de 4 à 5 mm de diamètre séparés d'environ 3 cm.

##### Préparation de la suspension bactérienne

Mettre en suspension, à partir d'une culture de 18 heures sur boîte de la souche à étudier, 4 à 5 colonies dans 0,5 ml d'eau physiologique puis vortexer.

##### Ensemencement

Remplir les puits du gel de 20  $\mu$ l de la suspension bactérienne préparée extemporanément.

### 3.2.2.3. Lecture

L'activité enzymatique se traduit par une zone décolorée qui apparaît autour des puits.

### 3.2.3. Test à la cloxacilline (De Champs et al., 2002)

#### 3.2.3.1. Principe

La cloxacilline est un antibiotique qui permet d'inhiber les  $\beta$ -lactamases de type AmpC. La restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, céfotaxime) en présence d'une concentration définie de cloxacilline, permet de confirmer le phénotype céphalosporinase.

#### 3.2.3.2. Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant de la cloxacilline à une concentration finale de 500  $\mu\text{g/ml}$  et de 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 3.2.3.3. Lecture

Un résultat positif est noté lorsqu'une augmentation des diamètres d'inhibition d'au moins 8 mm autour des disques de ceftazidime et de céfotaxime est observée.

### 3.2.4. Test de synergie (Philippon et Arlet., 2006)

#### 3.2.4.1. Principe

La démonstration phénotypique de la présence d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique.

#### 3.2.4.2. Technique

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablement ensemencée par la souche à tester, un disque de ceftazidime <sup>Cdz</sup> et/ou céfotaxime <sup>Ctx</sup> et un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), distant de 1 cm et  $\frac{1}{2}$ .

#### 3.2.4.3. Lecture

Un résultat positif est noté lorsqu'une image de synergie est observée entre les deux disques.

### 3.2.5. Test de Hodge (Lee et al., 2003)

#### 3.2.5.1. Principe

Il consiste à mettre en évidence l'hydrolyse de l'imipénème par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide d'une bactérie indicatrice sensible (*Escherichia coli*).

#### 3.2.5.3. Technique

- Préparer une suspension d'*Escherichia coli* ATCC25922 de  $10^8$  UFC/ml
- Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mueller Hinton
- Faire une lourde strie de la souche à tester à partir d'un prélèvement de quelques colonies d'une culture sur milieu Mueller Hinton gélosé du centre de la boîte vers la périphérie
- Sécher les boîtes 15 minutes
- Déposer un disque d'imipénème au centre (à l'extrémité de la strie)
- Incuber 18 heures à 37° C.

#### 3.2.5.4. Lecture

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* indicatrice ATCC 25922 (Figure 15).

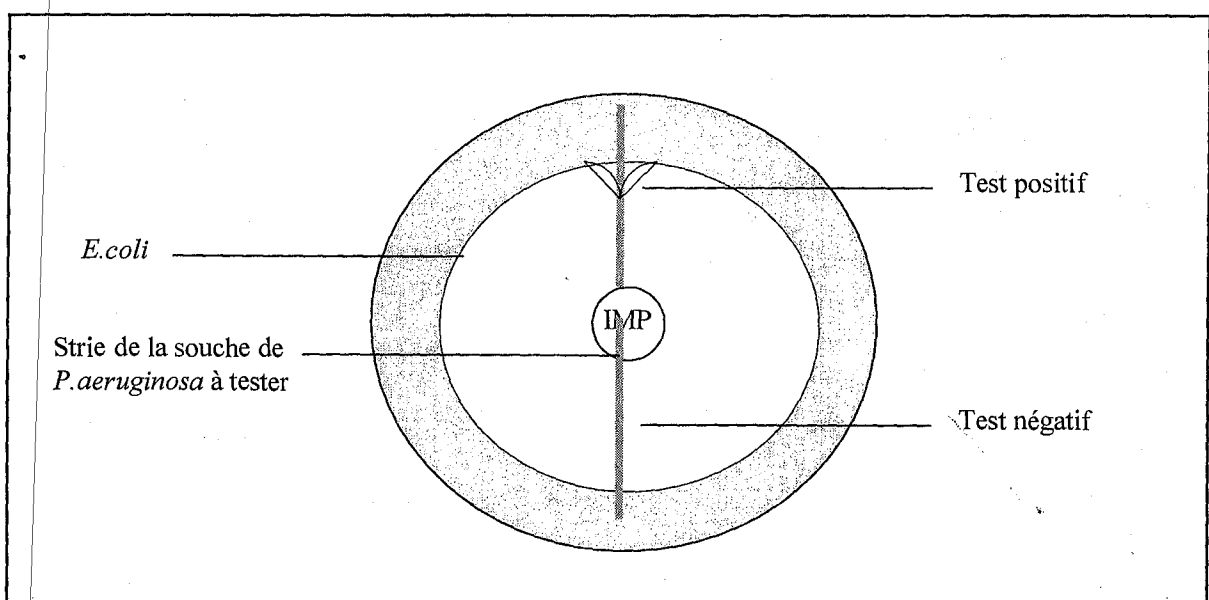


Figure 15 . Lecture du test de Hodge (Lee et al., 2003)



### 3.2.6. Test à l'EDTA (Jesudason et al., 2005)

#### 3.2.6.1. Principe

Il permet de différencier entre les métallo- $\beta$ -lactamases et les autres carbapénémases de classe A ou D.

#### 3.2.6.2. Technique

Elle consiste soit à déposer 4  $\mu$ l d'EDTA 0,5 M, pH 8, sur un disque d'imipénème soit 10  $\mu$ l d'EDTA 0,5 M, pH 8, sur un disque blanc (papier filtre Wathmann n°2, diamètre 6 mm), placé 1 cm et  $\frac{1}{2}$  bord à bord avec un disque d'imipénème.

#### 3.2.6.3. Lecture

Un résultat positif se traduit par un accroissement de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème supplémenté d'EDTA pour la première méthode et une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui de l'EDTA pour la deuxième.

### 3.2.7. Test au phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) (Lomovskaya et al., 2001)

#### 3.2.7.1. Principe

Il consiste à mettre en évidence l'inhibition du système d'efflux MexAB-OprM par le phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) (Sigma).

#### 3.2.7.2. Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant du PA $\beta$ N à une concentration finale de 25  $\mu$ g/ml.

#### 3.2.7.3. Lecture

Une augmentation des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques substrats indique un résultat positif.

### 3.3. Transfert des gènes de résistance : conjugaison (Tichat, 1995)

#### 3.3.1. Principe

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La sélection des

transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

### **3.3.2. Technique**

- Ensemencer la souche réceptrice et les souches donatrices en bouillon BHIB et incubé 18 à 24 heures à 37° C
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1/2
- Mélanger doucement
- Incuber 18 à 24 heures
- Réaliser des dilutions de  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  du mélange
- Ensemencer par strie le mélange et chaque dilution sur un milieu de sélection
- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice sur la même boîte
- Incuber 24 heures à 37° C.

### **3.3.3. Lecture**

Analyser les transconjugants en réalisant des antibiogrammes et/ou des CMI.

### **3.3.4. Préparation des boîtes de sélection**

Incorporer à une gélose Mueller Hinton, de la ticarcilline et de la ciprofloxacine à des concentrations finales de 64 µg/ml et de 1 µg/ml respectivement.

## **4. Caractérisation de la résistance aux β-lactamines**

### **4.1. Isoélectrofocalisation**

#### **4.1.1. Principe**

Il s'agit d'une méthode de séparation des protéines d'un mélange basé sur la différence de point isoélectrique (pI).

L'électrophorèse est pratiquée sur un support dans lequel un gradient est préétabli. Les protéines (enzymes) déposées migrent vers l'anode ou vers la cathode selon leur charge, mais au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge. Quand la charge nette est nulle, la protéine ne se déplace plus et focalise à l'endroit où le pH est égal au pI.

Le gradient de pH est créé en utilisant des ampholines supports : ce sont des mélanges de molécules de faibles masses molaires, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine. Par conséquent le pôle anodique attire les ampholytes acides, ayant un pI bas, le pôle cathodique attire les ampholytes alcalins, ayant un pI haut. Il se crée ainsi un gradient de pH qui augmente de l'anode à la cathode. La révélation s'effectue par la nitrocéfine, céphalosporine chromogène dont l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases s'accompagne d'une coloration orangée.

La détermination du pI de la  $\beta$ -lactamase exprimée par la souche à identifier va permettre de s'orienter vers une famille enzymatique.

#### **4.1.2. Technique**

Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 18h en milieu liquide de Mueller Hinton, récupérées par centrifugation et lysées par congélation-décongélation. Le lysat a été centrifugé pendant 30mn à 5000g à 4°C. Le surnageant a été soumis à une isoélectrofocalisation sur des plaques de gel PAG contenant des ampholines établissant un gradient de pH de 3,5 à 9,5(Pharmacia,Piscataway,N.J.) en utilisant un appareil LKB Multipor 2117 (Pharmacia) et la nitrocéfine (1mM dans 66mM de tampon Sørensen, pH 7,0) pour la révélation des  $\beta$ -lactamases.

#### **4.2. Etude de l'ADN par PCR**

##### **4.2.1.Extraction et purification de l'ADN génomique**

L'ADN est extrait sur QIAGEN (QIAamp DNA mini kit) selon les étapes suivantes :

- Récolter 4 à 5 colonies à l'aide d'une anse et les suspendre dans 180 $\mu$ l de tampon ATL (fourni dans le kit QIAamp DNA Mini) en agitant vigoureusement.
- Ajouter 20 $\mu$ l de Protéinase K, mélanger en vortexant puis incubé à 56°C jusqu'à ce que tout le tissu soit entièrement lysé. Vortexer de temps à autre pendant l'incubation afin de dissoudre les agrégats dans l'échantillon ou le placer dans un bain-marie à agitation ou sur un système équivalent.
- Centrifuger brièvement le tube de 1,5ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.

- Ajouter 200µl de tampon AL à l'échantillon , mélanger 15 sec en vortexant puis incubé 10 min à 70°C. Centrifuger brièvement le tube de 1,5ml pour récupérer les accumulées dans le capuchon.
  - Ajouter 200µl d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger 15 sec en vortexant. Après homogénéisation, centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml afin de récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.
  - Déposer le mélange obtenu(y compris le précipité) dans la colonne QIAamp( placée dans le tube collecteur de 2ml) sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1mn à 6000g(8000rpm) .Transférer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent.
  - Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et déposer 500µl de tampon AW1. Fermer le capuchon et centrifuger 1mn à 6000g (8000rpm)Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent.
  - Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500µl de tampon AW2 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 3 min à vitesse maximale (20000g ;14000rpm).
  - (Facultatif) : transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2ml (non fourni), et jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Centrifuger 1min à 20000g (14000rpm)
  - Transférer la colonne QIAamp dans un tube propre de 1,5 ml(non fourni). Jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir délicatement la colonne QIAamp et déposer 200µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber 1mn à température ambiante et centrifuger ensuite 1mn à 6000g (8000rpm).
  - Répéter la dernière étape et récupérer l'éluat.
- Pour une conservation de l'ADN de longue durée, il est recommandé de l'élué dans du tampon AE et de le conserver à -20°C.

#### **4.2.2 Amplification de l'ADN par PCR**

Les séquences nucléotidiques utilisées pour la détection des gènes de résistance enzymatique (TEM et/ou OXA) sont les suivantes :

Amorce 1(TEM-1): CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA

Amorce 2(TEM-2): ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG

Amorce 1(OXA-ISA):TTC GTG CTT TGT AAA AGT AG

Amorce 2(OXA-ISB):CCC TCA CTT GCC ATG ATT TT

Après extraction de l'ADN , les réactions d'amplification d'ADN par polymérase sont réalisées dans un thermocycleur Biometra T3 (Biolabo Scientific Instruments, Lausanne,Suisse) en présence de RedTaq DNA polymérase (Sigma-Aldrich, Milwaukee ,USA) en respectant les conditions spécifiées par le fournisseur.

Les conditions d'amplification sont les suivantes : 1 cycle de 5mn à 94°C puis 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 36°C, 45s/Kb du produit à amplifier à 72°C et enfin 1 cycle final de 7mn à 72°C.

Le mélange réactionnel (50µl) contient 1 unité de RedTaq DNA Polymérase<sup>R</sup>, 150µM de chaque dNTP, 0,25 µM de chaque amorce, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5µl de tampon PCR 10X, 10 ng d'ADN.

Cinq % (V/V) de DMSO sont ajoutés au milieu réactionnel pour augmenter la spécificité de l'amplification.

#### **4 .3. Séquençage de l'ADN**

Les fragments d'ADN sont séquencés par la méthode de terminaison de chaînes aux didéoxynucléotides triphosphate (ddNTPs) à l'aide d'un séquenceur automatique (Sanger,1977). Elle consiste en l'incorporation au hasard de ddNTPs dans un brin d'ADN en cours de synthèse , ce qui a pour conséquence un arrêt de l'élongation. Chacun des quatre ddNTPs utilisés est couplé à un fluorochrome différent. Après excitation par un faisceau laser, les quatre fluorochromes émettent des signaux lumineux de longueurs d'onde différentes détectables sur une piste de gel d'électrophorèse.

**PARTIE III**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## 1. Résultats

### 1.1. Souches identifiées

Pendant la période d'étude (Novembre 2005 – Juin 2007), 255 souches consécutives de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de 596 prélèvements cliniquement significatifs soit 42,8% (annexe9). L'identification par galerie API 20 NE (figure16) a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques du genre *Pseudomonas* : réduction des nitrates en nitrites, attaque du glucose par voie oxydative, présence d'une arginine dihydrolase et utilisation du glucose comme seule source de carbone. L'assignation des souches à l'espèce *aeruginosa* a été réalisée grâce à la présence d'une gélatinase, à l'assimilation de l'acide adipique, une oxydase positive ainsi qu'à la possibilité de culture à une température de 42° C et à la production d'une odeur aromatique particulière.

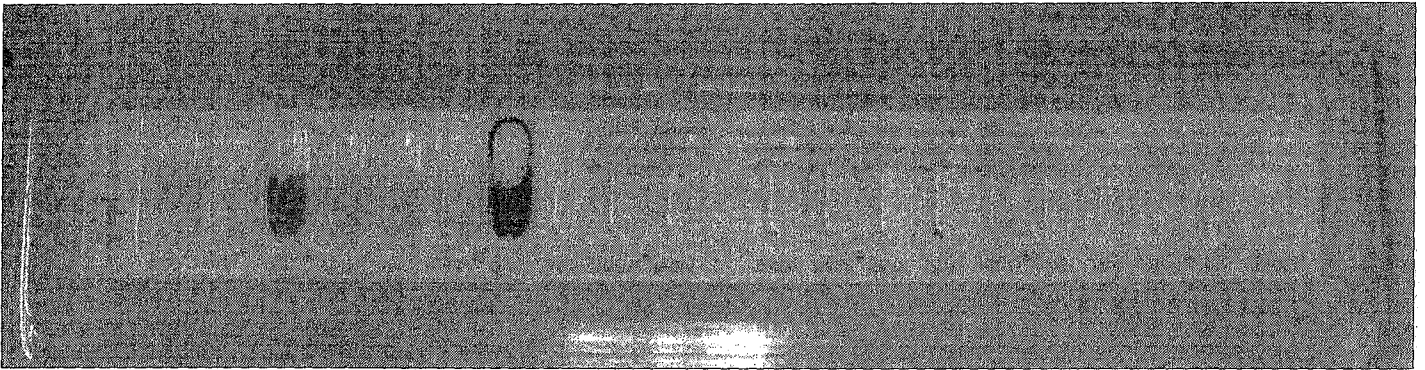


Figure 16. Résultat d'identification selon API 20NE

### 1.2. Résistance de *P. aeruginosa*

Les pourcentages de résistance selon les recommandations du CA-SFM sont résumés dans le tableau 4. Les taux de résistance aux antibiotiques étaient les suivants : ticarcilline (48%), ticarcilline + acide clavulanique (47%), pipéracilline (28%), pipéracilline + tazobactam (28%) ceftazidime (21%), cefepime (28%), aztreonam (41%), imipénème (40%), gentamicine (42%), tobramycine (24%), amikacine (23%) et une fluoroquinolone, la ciprofloxacine (5%). Les souches isolées en réanimation et en neurochirurgie ont montré un taux élevé de résistance à l'imipénème (54 et 59% respectivement).

On peut également observer des différences de taux de résistance en fonction des services, les écarts allant jusqu'à 49% et 58% entre la chirurgie et la neurochirurgie, respectivement pour l'imipénème et la gentamicine. Notons également 48% et 44% pour la ticarcilline et la ceftazidime entre la réanimation et la traumatologie. Ces écarts sont probablement dus aux pressions de sélection différentes suivant les services. Pour les aminosides, une résistance a été observée avec respectivement pour la gentamicine, tobramycine et amikacine, 41,6%, 24,3% et 23,1% (figure 17).

Les résultats ont également révélé une bonne activité antityocyannique de la ciprofloxacine avec un taux de 5,1%.

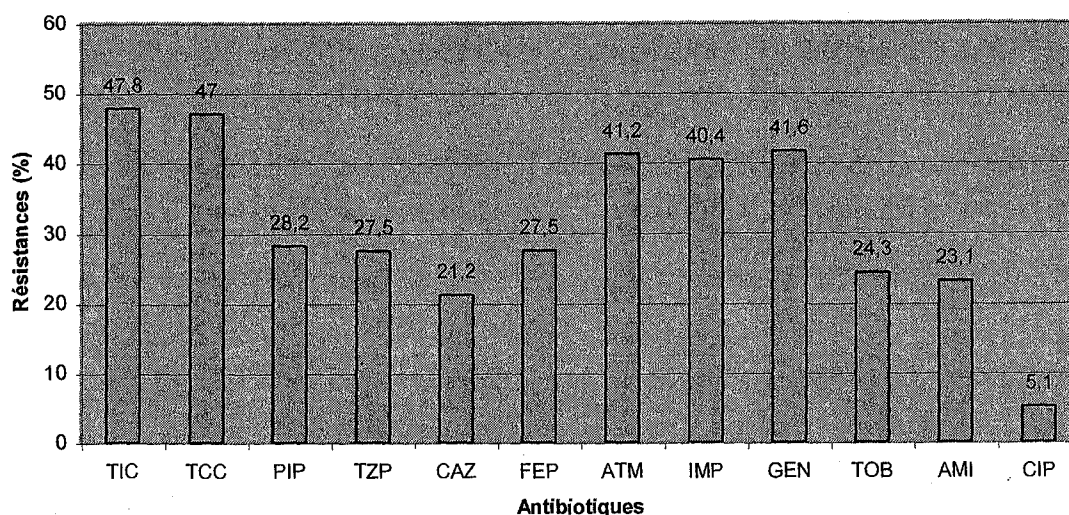
**Tableau 4. Résistance (%) des 255 souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de 12 antibiotiques selon les normes CA-SFM(www.sfm.asso.fr)**

	n	TIC	TCC	PIP	TZP	CAZ	FEP	ATM	IMP	GEN	TOB	AMI	CIP
Réanimation	92	72	72	59	59	46	55	61	54	53	49	49	9
Neurochirurgie	54	37	37	18	18	11	13	28	59	65	20	18	4
Traumatologie	46	24	19	6	4	2	6	22	33	37	6	6	0
Chirurgie	40	48	37	7	5	7	15	35	10	7	7	2	5
Divers	23	43	43	9	9	9	13	43	9	9	0	0	4
Total	255	48	47	28	27	21	27	41	40	42	24	23	5

TIC, ticarcilline; TCC, ticarcilline + acide clavulanique; PIP, pipéracilline; TZP, pipéracilline + tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP; céfépime; ATM, aztreonam; IMP, imipénème; GEN, gentamicine; TOB, tobramycine; AMI, amikacine; CIP, ciprofloxacine.



**Fig 17 . Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du CHU de Tlemcen**



### 1.3. Répartition des mécanismes de résistance aux bêtalactamines

L'utilisation d'antibiotiques comme marqueurs de détection phénotypique a permis de mettre en évidence les différents phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines rencontrés au niveau des divers services (tableau 5), chaque phénotype de résistance étant défini comme l'expression donnée par le mécanisme de résistance à cette classe d'antibiotiques. La méthodologie utilisée sur milieu solide est celle dérivée des propositions de Vedel (2005) et/ou sur milieu liquide selon les critères de Nordmann (2003)(annexes 11a et 11b).

**Tableau 5. Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

TIC	TZP	CAZ	FEP	IPM	Phénotypes observés
$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 8$	
8-16	2-4	0,5-2	0,5-4	1-4	Sauvage
8-16	2-4	0,5-2	0,5-4	8-16	Perte OprD
32-128	4-16	2-4	2-8	1-4	Efflux
64	32	32	16	1	Céphalosporinase (Case)
>512	128	64	32	4	Céphalosporinase +Pénicillinase
>512	16-32	1-2	2-4	2-4	Pénicillinase (Pase)
>512	32	2	2	16	Pénicillinase + Perte OprD
>512	64-256	16-64	16-32	32	Complexe

Sur l'ensemble des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, 48% étaient de sensibilité intermédiaire ou résistantes à la ticarcilline.

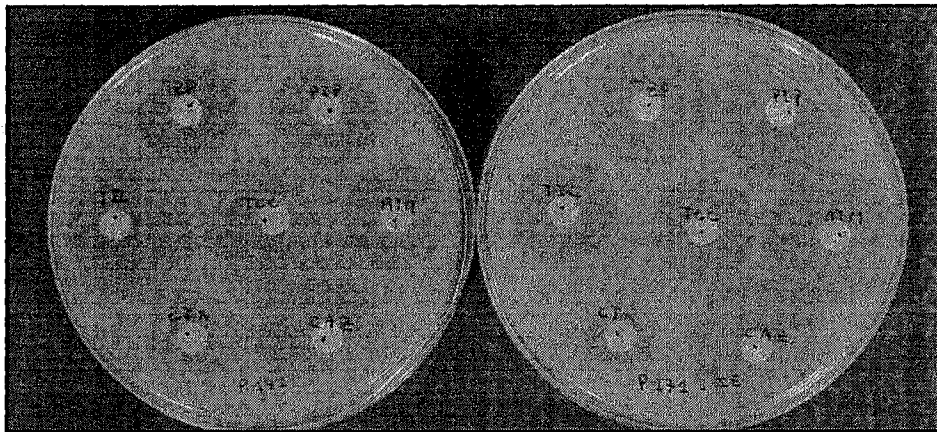
La répartition des mécanismes de résistance aux bêtalactamines (hors imipénème) était la suivante par rapport à l'ensemble des souches (Tableau 6) :

mécanisme de résistance probablement non enzymatique (efflux) (annexe 12a) , 17 %, hyperproduction constitutive isolée de la céphalosporinase et d'une bêtalactamase acquise, 3% et 6% respectivement. L'association d'une hyperproduction de la céphalosporinase et d'une bêtalactamase acquise était retrouvée chez 15 % des souches appartenant majoritairement (13%) au service de réanimation. Notons que parmi les souches sensibles à la ticarcilline (52%), 34% sont représentés par le phénotype sauvage et le reste, 18% par une résistance isolée à l'imipénème caractéristique d'un mécanisme d'imperméabilité lié probablement à la perte de la porine oprD<sub>2</sub>.

Le mécanisme de résistance isolée à l'imipénème est certainement lié à la modification de la porine D2 spécifique de la perméabilité de *P. aeruginosa* à cet antibiotique et il est retrouvé dans 40 % des cas. On peut aussi observer que ce taux atteint 54% en réanimation. Ce phénotype de résistance, est similaire au phénotype sauvage à

l'exception d'une diminution voire absence d'une zone d'inhibition sur antibiogramme et un passage de CMI de 1-2 à 8-32  $\mu\text{g/ml}$  pour l'imipénème (Livermore, 2001).

La caractérisation phénotypique du mécanisme d'efflux a été réalisée par le test au phényl-arginine- $\beta$ -naphtylamide (PA $\beta$ N). L'augmentation des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques testés en présence d'une concentration définie de cet inhibiteur a permis de confirmer ce phénotype (Figure 18).



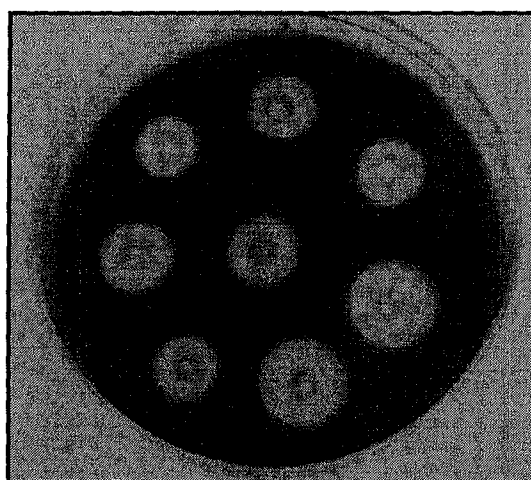
**Figure 18. Test au PA $\beta$ N**

**Tableau 6. Distribution (%) des mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des services.**

	S	OprD <sup>-</sup>	Case	AB+	Pase	Case, OprD <sup>-</sup>	AB+, OprD <sup>-</sup>	Pase, OprD <sup>-</sup>	Case, Pase, OprD <sup>-</sup>
Réanimation	26	2	1	9	10	8	4	3	37
Neurochirurgie	15	48	2	17	7	0	0	2	9
Traumatologie	44	33	2	17	4	0	0	0	0
Chirurgie	58	5	5	25	3	3	3	0	0
Divers	48	9	9	35	0	0	0	0	0
Total	34	18	3	17	6	3	2	2	15

S, type sauvage; OprD<sup>-</sup>, déficit en protéine OprD<sub>2</sub>; Case, hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC; AB+, surexpression de la pompe d'efflux MexAB-OprM; Pase, production de  $\beta$ -lactamase(s) transférable(s) ou pénicillinase.

La mise en évidence de la présence d'enzyme a été réalisée grâce au test iodométrique qui s'est révélé positif pour les souches présentant un phénotype céphalosporinase et/ou pénicillinase, éventuellement associé (Figure 19).



**Figure 19. Test iodométrique**

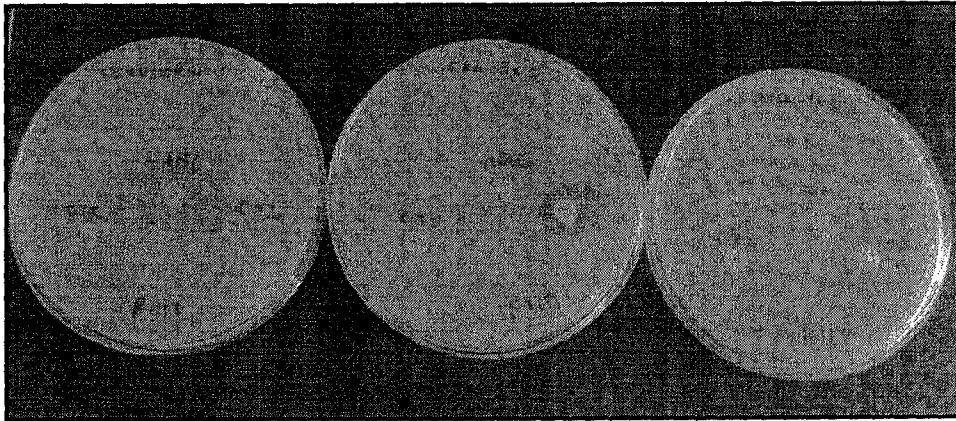
Pour les souches présentant un phénotype pénicillinase seul ou associé à une perte OprD (Tableau 7), l'association de l'acide clavulanique à la ticarcilline et du tazobactam à la piperacilline permettait de récupérer une meilleure activité de ces

antibiotiques. Les activités de la ceftazidime, du céfépime et celle de l'aztréonam n'étaient pas touchées par ce phénotype. Celle de l'imipénème était affectée seulement quand il y avait un mécanisme perte OprD associé.

Tableau 7. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype pénicillinase

	TIC	TCC	PIP	PTZ	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	Mécanisme suspecté
	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 8$	
P6	64	32	16	8	8	0,5	2	2	4	Pase
P88	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	Pase
P72	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	Pase
P37	128	64	32	16	32	1	8	4	4	Pase
P250	256	128	64	32	32	1	4	8	4	Pase
P200	>512	256	256	64	16	4	2	8	32	Pase + OprD
P197	>512	256	256	32	16	1	2	4	16	Pase + OprD
P179	>512	128	128	32	16	1	4	4	2	Pase
P173	>512	128	128	32	8	2	4	4	4	Pase
P172	>512	64	128	32	16	2	4	4	2	Pase
P168	>512	128	128	32	16	2	4	4	4	Pase
P162	256	64	64	32	16	2	4	4	2	Pase
P161	>512	128	128	32	8	2	4	2	4	Pase
P159	>512	128	128	32	16	2	2	4	16	Pase + OprD
P158	>512	128	128	32	32	2	2	4	16	Pase + OprD
P148	>512	64	128	16	16	2	2	4	2	Pase
P145	>512	128	128	32	16	2	4	4	2	Pase
P141	>512	64	128	32	16	2	4	4	2	Pase
P108	>512	256	128	32	16	1	4	4	2	Pase

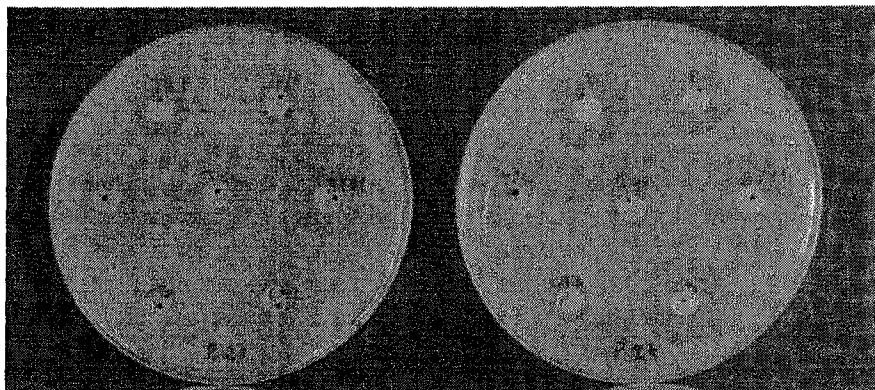
L'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique a été observée seule chez six souches (Tableau 8) ou associée à une perte de porine D2. Ce phénotype a été confirmé par la restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération (C3G) en présence de concentration définie de cloxacilline (Figure 20).



**Figure 20. Test à la cloxacilline**

Une concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  permettait de récupérer l'activité des deux C3G utilisées alors que celle de 500  $\mu\text{g/ml}$  ne restaurait que celle de la ceftazidime.

Pour ce qui concerne la P27, l'inhibition de la céphalosporinase a permis de mettre en évidence la présence d'une pénicillinase associée (Figure 21).



**Figure 21. Mise en évidence du phénotype pénicillinase + céphalosporinase**

Le caractère inductible de la céphalosporinase partiellement déréprimée exprimée par la P110 a été démontré par une image d'antagonisme entre l'imipénème et les céphalosporines à large spectre ainsi que par une diminution de l'activité de la ticarcilline par l'acide clavulanique.

Tableau 8. Résultats de CMI (µg/ml) pour les souches de phénotype céphalosporinase

	TIC	TCC	PIP	PTZ	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	Mécanisme suspecté
	≤16 >64	≤16 >64	≤16 >64	≤16 >64	≤4 >32	≤4 >32	≤4 >32	≤4 >32	≤4 >8	
P8	32	64	64	32	128	8	8	8	4	Case
P11	64	128	128	128	>512	32	32	32	8	Case + OprD
P77	64	64	64	64	512	16	8	16	2	Case
P110	64	256	32	32	512	32	16	32	1	Case
P137	64	64	16	16	64	8	32	16	2	Case
P169	64	128	64	32	512	32	16	8	2	Case
P191	64	128	128	128	512	16	16	16	32	Case + OprD
P218	64	128	32	32	512	16	4	16	4	Case
P219	64	256	256	128	512	32	32	32	32	Case + OprD
P221	128	256	256	128	512	16	32	32	32	Case + OprD
P224	128	256	256	128	>512	16	32	16	32	Case + OprD
P230	128	256	256	128	512	16	32	16	32	Case + OprD
P236	128	256	256	128	512	16	32	16	32	Case + OprD
P237	128	256	256	128	>512	16	32	16	32	Case + OprD

39 (15%) souches de phénotype complexe ont été observées uniquement au niveau des services dits de soins intensifs dont 34(13%) appartiennent au service de réanimation et 5 (2%) au service de neurochirurgie. Elles ont présenté une résistance aux carboxypénicillines, uréidopénicillines, céphalosporines de troisième et quatrième génération, monobactame et carbapénème (Tableau 9).

Tableau 9. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches de phénotype complexe

	TIC	TCC	PIP	PTZ	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	Mécanisme suspecté
	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 32$	$\leq 4 > 8$	
P27	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	Case + Pase
P176	>512	256	512	128	512	32	16	32	32	Case + Pase + OprD
P178	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P180	>512	256	>512	128	>512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P183	>512	256	512	128	512	16	16	32	32	Case + Pase + OprD
P184	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P185	>512	256	512	128	>512	64	32	16	32	Case + Pase + OprD
P186	>512	256	>512	128	512	16	8	16	32	Case + Pase + OprD
P187	>512	256	256	64	256	16	8	8	32	Case + Pase + OprD
P188	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P189	>512	256	512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P192	>512	256	>512	256	>512	64	64	64	32	Case + Pase + OprD
P193	>512	256	512	128	>512	32	16	32	32	Case + Pase + OprD
P195	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P198	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P199	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P201	>512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P202	>512	256	512	128	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P203	>512	256	>512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P204	>512	256	>512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P205	>512	256	>512	128	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P206	>512	256	>512	256	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P207	512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P208	>512	256	>512	256	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P209	>512	256	>512	512	>512	128	64	64	32	Case + Pase + OprD
P210	512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD
P211	>512	256	>512	128	512	32	16	16	32	Case + Pase + OprD
P220	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P222	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P223	>512	512	>512	256	>512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P225	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P235	>512	512	>512	256	>512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD
P238	512	256	512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P239	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	Case + Pase + OprD
P240	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD
P241	>512	256	>512	128	>512	16	16	16	32	Case + Pase + OprD
P242	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P243	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P253	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD
P255	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD



La caractérisation phénotypique de ces souches a été réalisée par les tests à la cloxacilline, synergie, Hodge et EDTA. Aucune BLSE ou carbapénémase n'a été détectée. La récupération de l'activité des C3G par la cloxacilline a permis de mettre en évidence la présence d'une AmpC associée à une pénicillinase. La résistance à l'imipénème (CMI = 32) a été attribuée au mécanisme perte OprD.

#### 1.4. Résistances associées

Les résistances associées aux aminoglycosides étaient les plus fréquentes chez les souches productrices de bêtalactamases (tableau 10). Parmi les mécanismes non enzymatiques, la résistance à la gentamicine a concerné surtout les souches qui ont présenté le phénotype OprD<sub>2</sub> dans 77% des cas, contrairement aux systèmes d'efflux qui se sont révélés associés dans tous les cas à une sensibilité à tous les aminosides.

On peut également noter que la résistance à la ciprofloxacine était surtout représentée par les souches de phénotype "Case+OprD" avec un taux de 63%(5/8) provenant toutes du service de réanimation.

Tableau 10. Résistances associées

Phénotype	n	Nombre de souches résistantes			
		GM	TM	AN	CIP
Sauvage	86	5	1	0	1
OprD	47	36	5	0	1
Efflux	43	8	0	0	1
Efflux + OprD	5	0	0	0	3
Case	7	1	0	1	0
Pase	16	16	16	16	1
Case + OprD	8	0	0	0	5
Pase + OprD	4	4	4	4	0
Case + Pase + OprD	39	39	34	36	0

n : nombre total de souches isolées

### 1.5. Acquisition de la résistance

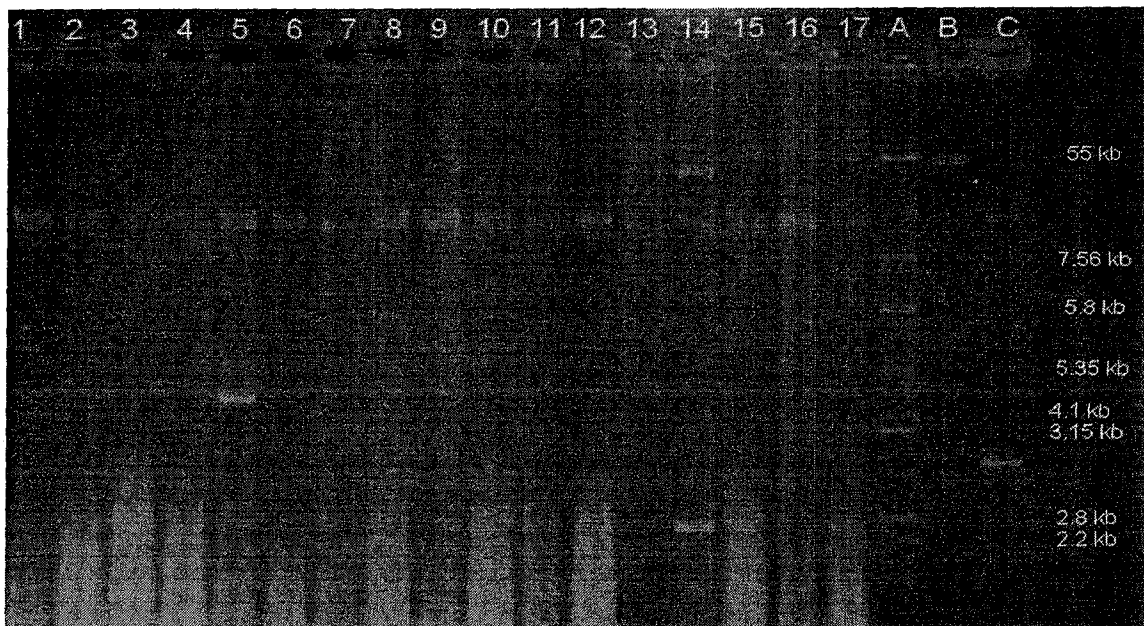
Les expériences de conjugaison , réalisées entre 7 souches cliniques sensibles à la ciprofloxacine et la souche réceptrice *P. aeruginosa* PU21 résistante à la ciprofloxacine, ont permis le transfert de la résistance aux bêtalactamines (excepté l'imipénème) . La résistance à la gentamicine , tobramycine et amikacine ont été co-transférées( tableau 11 ).

**Tableau 11. Résultats de CMI (µg/ml) obtenus pour les transconjugants**

	TIC ≤16>64	TCC ≤16>64	PIP ≤16>64	TAZ ≤16>64	CTX ≤4>32	CAZ ≤4>32	FEP ≤4>32	ATM ≤4>32	IPM ≤4>8	GEN ≤4>8	TOB ≤4>8	AMI ≤8>16	CIP ≤1>2
<b>CIP R</b>	32	32	16	16	<b>16</b>	2	8	8	2	2	1	2	2
<b>27</b>	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	64	8	32	0.25
<b>T27</b>	>512	128	128	32	<b>16</b>	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>72</b>	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	>512	8	64	0.25
<b>T72</b>	>512	128	64	32	<b>16</b>	2	8	8	2	256	8	64	2
<b>88</b>	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	>512	8	64	0.25
<b>T88</b>	>512	128	64	32	<b>16</b>	2	8	8	2	256	8	64	2
<b>108</b>	>512	256	128	32	16	1	4	4	2	>512	8	64	0.25
<b>T108</b>	>512	128	128	32	<b>16</b>	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>148</b>	>512	64	128	16	16	2	2	4	2	>512	8	64	0.25
<b>T148</b>	>512	64	128	16	<b>16</b>	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>158</b>	>512	128	128	32	16	2	2	4	16	>512	16	128	0.25
<b>T158</b>	>512	128	128	32	<b>16</b>	2	8	8	2	512	8	64	2
<b>239</b>	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	>512	16	128	0,25
<b>T239</b>	>512	128	128	32	<b>16</b>	2	8	8	2	512	8	64	2

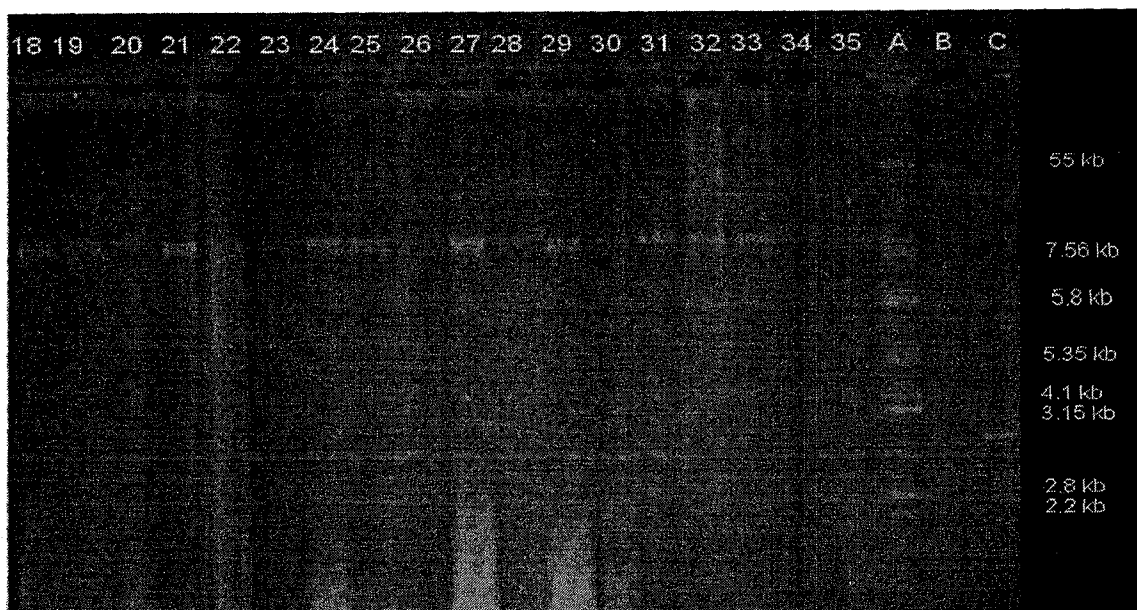
### 1.6. Plasmides : visualisation sur gel d'agarose

La visualisation du contenu plasmidique des souches (Figures 22a et 22b) a révélé la présence de deux plasmides chez la souche P37, dont l'un de grande de taille (50 Kilobases) et un petit de 2,8 Kb. La souche P6 (bande 5) contient un plasmide de taille comprise entre 4,1 et 5,35kb.



**Figure 22a . Profil plasmidique des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa***

(1 : P1), (2 : P2), (3 : P4), (4 : P5), (5 : P6), (6 : P8), (7 : P10), (8 : P11), 9 : P27), (10 : P29), (11 : P30), (12 : P33), (13 : P36), (14 : P37), (15 : P42), (16 : P43), (17 : P51), (35 : P110), (A : VP517), (B : pRK 2013), (C : pBR 322)



**Figure 22b . Profil plasmidique des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa***

(18 : P57), (19 : P66), (20 : P67), (21 : P72), (22 : P73), (23 : P76), (24 : P80), (25 : P83), 26 : P88), (27 : P89), (28 : P90), (29 : P92), (30 : P95), (31 : P101), (32 : P103), (33 : P105), (34 : P108), (35 : P110), (A : V517), (B : 2013), (C : Pbr 322)

### 1.7. Sérotypage et analyse par RAPD

Parmi les souches étudiées, nous avons pu déceler des phénotypes très proches, en particulier celles appartenant au groupe des pénicillinases, associées à une résistance à tous les aminosides. Il est à noter que les souches productrices de pénicillinases ont été plus fréquemment isolées dans le service de réanimation (26 sur les 33). Ces souches ont été soumises à un typage sérologique et génétique par RAPD dans le but de rechercher leur éventuelle dissémination dans l'hôpital de Tlemcen. L'analyse par RAPD (figures 23a et 23b) a montré que 32 isolats se distribuaient dans 6 génotypes dénommés A, B, C, D, E et F correspondant à 21, 3, 2, 2, 3 et 1 isolats, respectivement. Les génotypes A, C et D ont été de sérotype O:11, tandis que les génotypes E et F appartenaient aux sérotypes O:5 et O:12, respectivement. Les isolats du génotype B ont été assignés à O:5 ou O:8. Il est à noter que 20 des 21 isolats appartenant au génotype A (tableau 12) ont été isolés dans le service de réanimation. On assisterait donc à l'émergence d'une souche MBR dans ce service de réanimation du CHU de Tlemcen.

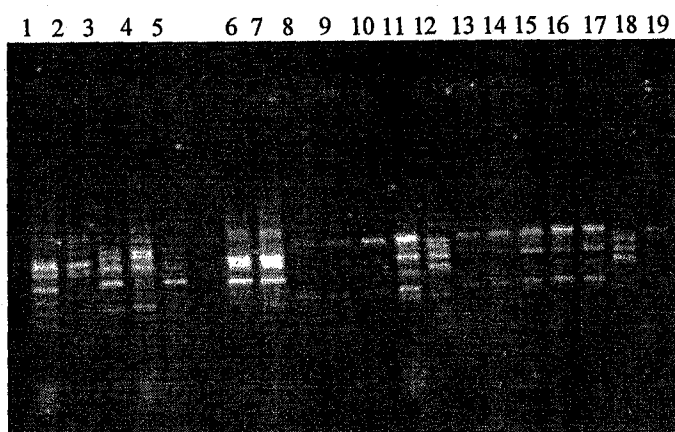


Figure 23a . Résultats de l'analyse par RAPD(amorce 272)

1(P6) ;2(P37) ;3(P141) ;4(P148) ;5(P172) ;6(P88) ;7(P108) ;8(P145) ;9(P158) ;10(P159) ;  
11(P160) ;12(P161) ;13(P162) ;14(P168) ;15(P173) ;16(P176) ;17(P178) ;18(P179) ;19(P180)

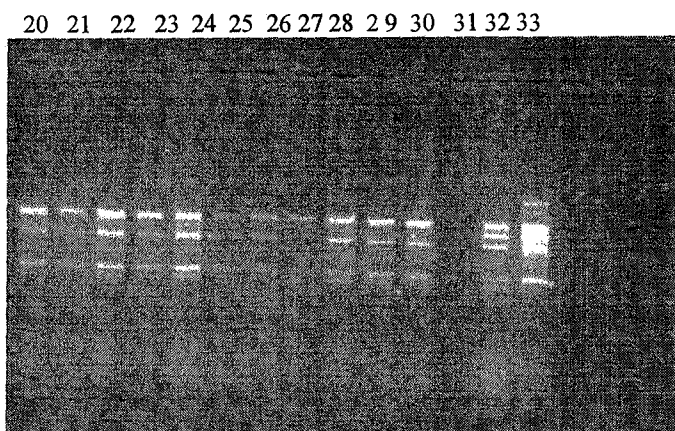


Figure 23b :Résultats de l'analyse par RAPD(amorce 272)

20(P183) ;21(P184) ;22(P185p) ;23(P185g) ;24(P186) ;25(P187) ;26(P188) ;27(P189) ;  
28(P192) ;29(P193) ;30(P195) ;31(P197) ;32(P198) ;33(P199)

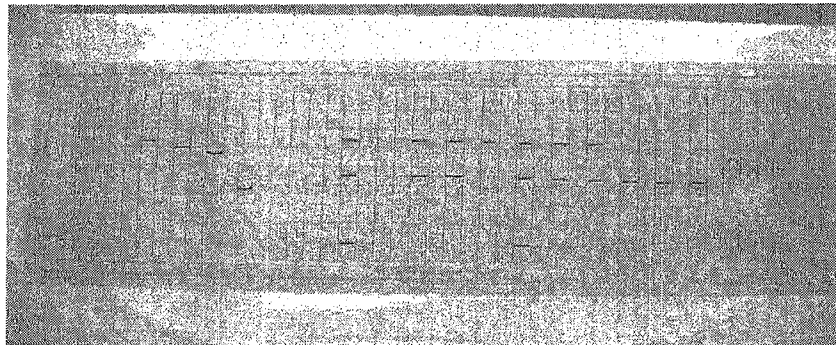
Tableau 12 . Répartition des souches en fonction des génotypes

Génotypes	Souches
A	145,158,159,162,168,173,176,178,180,183,184,185,186,187,188,189,192,193,195,197,198
B	141,148,172
C	160,199
D	161,179
E	88,108
F	37

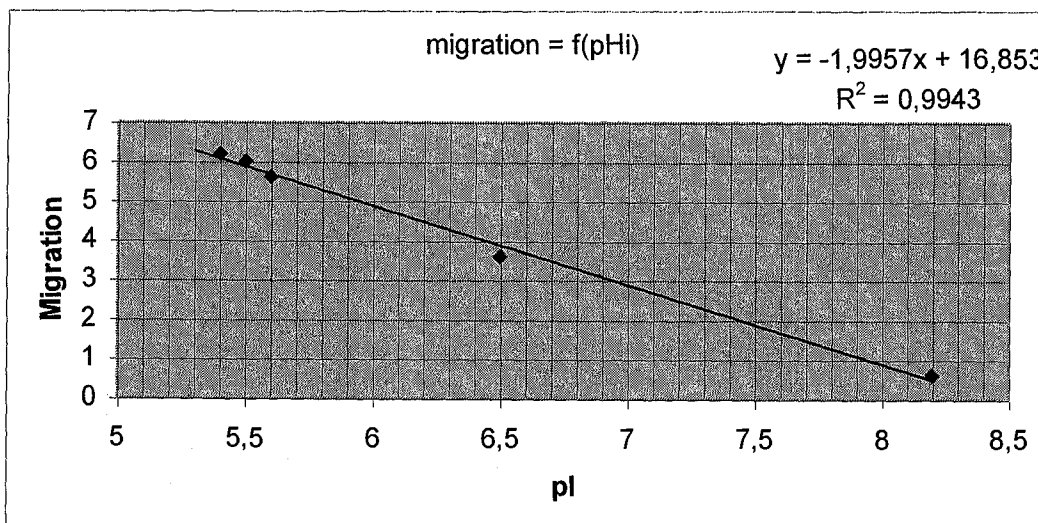
**1.8. Caractérisation des bêtalactamases transférables.**

**1.8.1. Détermination des points isoélectriques (pI)**

Le contenu en bêta-lactamases de 2 souches par génotype, sélectionnées au hasard, a été analysé par isoélectrofocalisation (figures 24 et 25). La révélation par la nitrocéfine a mis en évidence une bande (pI, 6.2) chez les 12 souches, correspondant à une enzyme OXA-like. De plus, 10 d'entre elles ont produit une  $\beta$ -lactamase TEM-like de pI 5.3 et 2 ont surproduit la céphalosporinase chromosomique AmpC (pI, 8.1).



**Figure 24 . Résultats de l'isoélectrofocalisation**



**Figure 25. Courbe de migration**

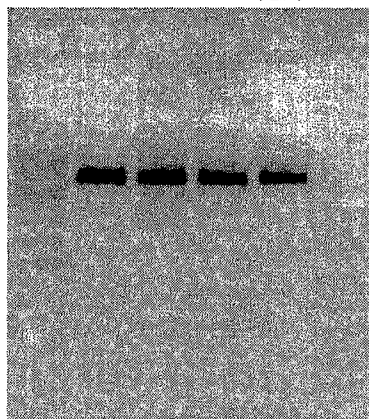
### 1.8.2. PCR et séquençage

Les résultats de PCR (figure 26) et séquençage ont permis d'identifier ces  $\beta$ -lactamases comme des OXA-10 (connu aussi sous le nom de *pse-2*) et TEM-110, en accord avec les pI obtenus (tableau 13).

Tableau 13 . Résultats de l'analyse des pénicillinases

souche	Phi	Migration	enzyme	PCR	Séquençage
PER-1	5,3		-		
TEM-1	5,4	6,2	-		
OXA-18	5,5	6	-		
TEM-2	5,6	5,6	-		
TEM-24	6,5	3,6	-		
AmpC	8,2	0,6			
Souches Tlemcen	6,19	4,5	TEM, OXA	OXA	OXA-10
	5,29	6,3	TEM, PER, (VEB)	TEM	TEM-110
	8	0,9	AmpC		

PCR OXA 02/04/07



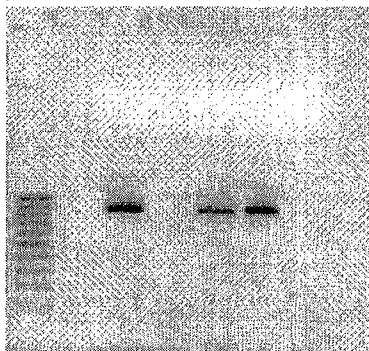
PM T+ P88 P141 P162 T-

PCR TEM 30/08 /2006



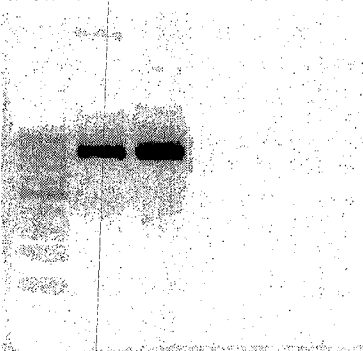
PM T+ P72 T-

PCR TEM 31/08/2006



PM T+ P88 P108 T-

PCR TEM 30 /03 /2007



PM T+ P141 T-

Figure 26 . Résultats de l'analyse par PCR (OXA et TEM)



## 2. Discussion

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* et antibiorésistance

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif d'importance majeure dans le cadre des infections hospitalières de par sa fréquence, la gravité des infections liée à la survenue chez les malades immunodéprimés, sa grande adaptabilité et sa rapidité d'acquisition de résistance aux antibiotiques. Cependant l'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas une preuve de leur implication dans le processus infectieux en cours, car ils ne sont souvent que de simples colonisateurs (Mesaros et al., 2007). Ce germe étant répandu dans l'environnement hospitalier, son manuportage par les patients et le personnel soignant favorise sa dissémination (Carmeli et al., 1999). Il présente une remarquable capacité de colonisation des patients immunodéprimés particulièrement dans les services de soins intensifs (Bertrand et al., 2003). Différents facteurs de risque associés à l'acquisition de cette bactérie ont été identifiés, dont la durée du séjour et l'antibiothérapie (Blanc et al., 1998).

*Pseudomonas aeruginosa* est un germe dont les résistances acquises sont fréquentes. Il s'agit de résistances parfois associées entre elles, transitoires et adaptatives, c'est-à-dire favorisées par la pression de sélection de l'antibiothérapie (Aubron et al., 2002). Les taux de résistance aux antibiotiques étudiés, plus importants dans les service de soins intensifs , rapportés par cette étude sont certainement liés aux différentes pressions de sélection exercées conséquences des types de pathologie traités.

Comparée aux données d'antibiosurveillance de l'Institut Pasteur d'Algérie, rapportées par Rahal en 2005 (Rahal et al., 2005), la résistance des souches étudiées aux différents antibiotiques est supérieure dans notre étude pour la ticarcilline, l'imipénème et la gentamicine avec des écarts de 30, +28 et +23% respectivement. La fréquence globale de résistance aux  $\beta$ -lactamines, exprimée par la résistance à la ticarcilline, atteint 48%, taux identiques à ceux rapportés dans une étude multicentrique menée en France par Cavallo en 2004 (Cavallo et al., 2007), cependant, la résistance à l'imipénème reste plus importante dans notre étude avec une différence de 20%. Les taux de résistance à la pipéracilline (28%) et à la ceftazidime(22%) sont supérieurs à ceux de l'étude de Rahal (16 et 11%), mais concordent avec ceux de Cavallo en 2004. Pour ce qui concerne le taux de résistance à

la ciprofloxacine, il est en dessous des données algériennes et françaises avec des écarts de -10% et -27% respectivement. Si ces différences ne peuvent être comparées statistiquement du fait de la variabilité entre les types d'hôpitaux et les services inclus dans ces enquêtes, les écarts sont cependant importants et sont vraisemblablement en relation avec la pression de sélection exercée par l'utilisation de ces antibiotiques. La surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques permet d'adapter l'antibiothérapie probabiliste, car les infections à *Pseudomonas aeruginosa* du fait de leur gravité, mettent en jeu le pronostic vital et vont nécessiter une antibiothérapie rapidement débutée de plus bactéricide (Hamze et al., 2004).

La détection des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* en routine, est particulièrement importante (Bert et al., 2003) car elle permet la suppression des fausses sensibilités aux antibiotiques qui en réalité, sous l'influence des mécanismes de résistance impliqués et interférant ne peuvent être valablement retenus pour actifs dans le cadre d'une antibiothérapie (Monteil, 2003).

La grande majorité des bactéries classées dans le groupe « résistance non enzymatique », qui rassemble les souches ne produisant pas de  $\beta$ -lactamases acquises et dont les taux de céphalosporinase sans induction est voisin de celui des souches sensibles, est représentée par une résistance isolée à l'imipénème (43,2%). Ce phénotype caractéristique de la modification de la porine D<sub>2</sub> spécifique de la perméabilité de *Pseudomonas aeruginosa* à cet antibiotique (Philippon, 1998) a aussi été retrouvé parmi les souches présentant un phénotype pénicillinase et/ou associé à une céphalosporinase. L'hyperproduction de l'AmpC associée à la fermeture de la porine D<sub>2</sub> conduit à une augmentation des CMI de l'imipénème plus importante que la fermeture isolée de la porine D<sub>2</sub> (Cavallo et al., 2001). La prédominance de ce mécanisme de résistance au niveau de l'hôpital de Tlemcen, en particulier dans les services de soins intensifs (réanimation et neurochirurgie) est certainement liée à l'utilisation massive de l'imipénème. En effet, la prévalence des phénotypes de résistance observés au sein d'un service constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription (Bertrand et al., 2003).

La résistance à la ticarcilline par un mécanisme non enzymatique (19%), est probablement due à l'association d'une perméabilité diminuée et d'une

hyperexpression de l'efflux, essentiellement système d'efflux MexAB-OprM, constitutif chez cette bactérie (Masuda et al., 2000). Le phénotype des souches surexprimant ce système d'efflux est caractéristique : la ticarcilline et l'aztréonam sont presque toujours classés intermédiaires, tandis que les uréidopénicillines moins touchées, restent le plus souvent classés sensibles ainsi que la ceftazidime. L'imipénème n'est pas affecté par ce mécanisme de résistance (Péchère et Kohler., 1999 ; Plésiat et al., 1998). L'inhibition de l'efflux MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa* par le phényl-arginine- $\beta$ -naphtylamide (PABN) augmente l'activité des différentes  $\beta$ -lactamines (Lomovskaya et al., 2001). Cependant, cette récupération d'activité ne peut être observée que chez les souches qui n'expriment pas un haut niveau de  $\beta$ -lactamases (Masuda et al., 1999).

La résistance aux céphalosporines de troisième et quatrième génération chez *Pseudomonas aeruginosa* est associée dans la plupart des cas à l'hyperproduction de la céphalosporinase naturelle (Nordmann et Guibert., 1998). La dérégulation de cette  $\beta$ -lactamase AmpC affecte 21% des souches isolées, dont 15% présentent un phénotype pénicillinase associé. Le céfépime et l'aztréonam résistent mieux que la ceftazidime à l'hyperproduction de la céphalosporinase alors que la ceftazidime reste la plus active sur les souches exprimant un mécanisme non enzymatique ou une pénicillinase. L'expression phénotypique de ces différentes  $\beta$ -lactamases est dans la majorité des cas une base de départ rapide de leur identification future. Cependant, la combinaison de plusieurs mécanismes de résistance rend plus complexe l'individualisation pratique d'un phénotype (Philippon et Arlet., 2006).

La fréquence des résistances associées aux aminosides parmi les souches productrices de  $\beta$ -lactamases acquises et parmi les souches hyperproductrices de céphalosporinases AmpC peut résulter soit de l'accumulation de mécanismes de résistance indépendants, soit de la diffusion de matériel génétique (plasmides, transposons) codant plusieurs caractères de résistance ( $\beta$ -lactamines, aminosides ....) (Cavallo et al., 2001). Ce cumul de résistances est une preuve supplémentaire du rôle de la pression de sélection des antibiothérapies lourdes, à l'origine de la diffusion de matériel génétique regroupant plusieurs mécanismes de résistance dans les familles différentes d'antibiotiques (Rio, 2002). La résistance de *P.aeruginosa* aux bêtalactamines est variable d'un pays à l'autre (Weinstein et al., 1983 ; Howard et al., 1995 ; Benjemaa

et *al.*,2004). Comparativement à ce qui a été décrit dans la littérature, l'incidence de la résistance de nos souches de *P.aeruginosa* aux bêtalactamines est très importante. Particulièrement, le taux de résistance à l'imipénème (35%) a été élevé comparé à ceux communément observés dans les pays européens(E.A.R.S.S.,2007). Cette résistance prévalente qui résulte d'altérations dans la porine OprD pourrait s'expliquer par la forte consommation de l'imipénème à l'hôpital de Tlemcen, où ce composé est prescrit empiriquement dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* et à la dissémination d'un clone O:11 dans le service de réanimation chirurgicale. La résistance à tous les aminosides a surtout concerné les souches appartenant au phénotype pénicillinase. En effet, lorsqu'il y a une bêtalactamase transférable isolée, la ceftazidime n'est pas touchée alors que le taux de sensibilité aux aminoglycosides sont les plus bas (Philippon,1998). Par ailleurs, le faible taux de résistance à la ciprofloxacine (11%) concorde bien avec l'utilisation modérée des fluoroquinolones à l'hôpital de Tlemcen durant la période de cette étude. Nous n'avons pas observé de souches à haut niveau de résistance (CMI de la ciprofloxacine  $\leq 4$  mg/l). Ces données confirme la corrélation entre l'usage des fluoroquinolones et l'émergence de la résistance( Neuhauser,2003) .

## 2.2. Epidémiologie des souches

L'acquisition de la résistance aux carboxypénicillines, uréidopénicillines et aminosides par la souche PU21 CIP R après conjugaison, conforte l'hypothèse de dissémination de matériel génétique codant pour le phénotype pénicillinase et résistance aux aminosides.

L'absence de plasmides au niveau de la plupart des souches (figure22b) laisse suggérer que la résistance est un caractère qui pourrait être porté par des transposons.

Ces éléments génétiques présents sous forme intégrée au chromosome sont capables de s'exciser pour former une molécule circulaire non-répliquative qui peut alors être transférée par conjugaison à la cellule hôte (Schwarz et *al.*, 1991). Le transposon ainsi transféré est ensuite inséré dans le chromosome de la cellule hôte (Doublet, 2004).

Le typage génétique et sérologique a mis en évidence un clone épidémique (génotype A et sérotype O:11) dans le service de réanimation chirurgicale, correspondant à 31%

de tous les *P. aeruginosa* isolés dans ce lieu. Ce clone a été résistant à la ticarcilline ( $\pm$  clavulanate), pipéracilline ( $\pm$  tazobactam), gentamicine et tobramycine. En outre, 12 isolats de ce clone (55%) ont été résistants à la ceftazidime et au céfépime par dérégulation de AmpC. La perte ou l'altération de la porine OprD a entraîné la résistance à l'imipénème chez 17 isolats (77%). Treize (59%) et 14 (64%) isolats ont été résistants à l'amikacine et ciprofloxacine, respectivement. Enfin, 4 isolats du clone A ont été résistants aux antibiotiques testés.

### 2.3. Caractérisation de la souche épidémique

Les expériences de conjugaison ont montré que la résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines et aux aminoglycosides ont été facilement transférables entre les isolats de *P. aeruginosa*. Ceci signifierait que les gènes conférant ces résistances sont portés par des éléments génétiques mobiles (comme par exemple un intégron lié au plasmide) qui se disséminent parmi les isolats de *P. aeruginosa*, indépendamment de leur génotype. L'analyse par isoélectrofocalisation et par PCR des souches productrices de pénicillinases transférables ainsi que le séquençage ont permis d'identifier ces  $\beta$ -lactamases comme des OXA-10 et TEM-110. Il faut noter que *TEM-110* a été déjà rapportée chez *Salmonella* non typhoïdique en Algérie vers la fin des années 80. Les entérobactéries apparaissent donc comme un réservoir plausible de ce gène, jamais décrit auparavant chez *P. aeruginosa*. Nous n'avons pas observé de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi ou de carbapénémase dans cette étude

Les épidémies de souches de *P. aeruginosa* multirésistantes dans les unités de soins intensifs sont souvent associées à une grande fréquence de mortalité (Grundman,1993). La fréquence des résistances associées aux bêtalactamines est liée le plus souvent à la dissémination de souches épidémiques MBR comme celles productrices de pénicillinases et peut résulter soit de l'accumulation de mécanismes de résistance des différentes antibiothérapies successives, soit de la diffusion de matériel génétique( plasmides, intégrons) codant pour plusieurs caractères de résistance ( bêtalactamases et enzymes de modification des aminoglycosides) (Pitt,1990). A l'échelle d'un service de soins ou d'un hôpital, la part des colonisations et/ou infections liées à des mesures d'hygiène défectueuses peut être importante, voire prépondérante

comme lors de la survenue de phénomènes épidémiques (Pellegrino et *al.*,2002 ; Berthelot et *al.*, 2005). Dans la littérature la plupart des épidémies dues aux souches de sérotype O:11 sont liées à des réservoirs environnementaux hydriques et les clones épidémiques et multirésistants observés dans différents hôpitaux non liés sur le plan épidémiologique sont différents entre eux. (Loureiro et *al.*,2002 ; Kalai et *al.*,2005). En terme de résistance acquise aux antibiotiques, plusieurs évolutions ont été révélées dans divers pays avec la découverte de nouvelles bêtalactamases , leur permettant de résister aux céphalosporines de troisième génération comme la ceftazidime ou mieux aux carbapénèmes (Hamze et *al.*,2004 ). Pour *P. aeruginosa* , la notion de diffusion clonale est moins univoque que dans les SARM ou les BLSE, cependant le risque de transmission horizontale est réel et des situations épidémiques sont régulièrement rapportées (Cattoen et *al.*,1999 ; Watine et *al.*,1996 ) .

# **CONCLUSION**

Cette étude est la première sur la résistance et l'épidémiologie de souches cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie et montre bien les hauts niveaux de résistance aux antibiotiques en particulier dans les services de soins intensifs et confirme l'importance de *P.aeruginosa* à l'hôpital de Tlemcen. Les résultats révèlent de très grandes différences quant à la distribution des mécanismes de résistance au niveau de chaque service.

La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* est devenue une préoccupation à l'hôpital de Tlemcen. En effet, *P.aeruginosa* représente l'une des principales bactéries responsables d'infections nosocomiales et elle est souvent associée à une mortalité élevée. Ces infections sont favorisées par l'immunodépression, l'antibiothérapie préalable et les procédures invasives (Bert,2002).

Les principaux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines sont l'hyperproduction de céphalosporinase, la production de pénicillinase, l'efflux actif et le déficit en porine D<sub>2</sub>. Les résultats de ce travail confirment les données de la littérature qui ont montré une augmentation de la prévalence de *P. aeruginosa* multirésistant dans les hôpitaux méditerranéens (Amazian,2006). Les niveaux de résistance atteints vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques comme les carbapénèmes (40%) sont alarmants, particulièrement dans les services de réanimation chirurgicale (54%) et neurochirurgicale (59%). La résistance à l'imipénème est codée par un mécanisme non enzymatique dans 18% des cas vu la sensibilité de ces souches au ceftazidime et à la pipéracilline. Elle est associée à d'autres mécanismes comme l'hyperproduction de la céphalosporinase (3%) et l'efflux (2%). L'utilisation de l'imipénème pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* pourrait être un facteur de risque pour la sélection de ce mécanisme de résistance (Kohler et al.,1999; Deplano et al., 2005).

Nous rapportons également dans ce travail un épisode épidémique d'infection à *P.aeruginosa* de sérotype O:11 à l'unité de réanimation chirurgicale. Ces souches sont caractérisées par une multirésistance à plusieurs familles d'antibiotiques, ce qui réduit le choix thérapeutique contre ces souches. Une thérapie fondée sur la combinaison d'antibiotiques, généralement une pénicilline antipseudomonas-inhibiteur de  $\beta$ -lactamase et un autre antibiotique le plus souvent un aminoglycoside ou quinolone, est la règle générale pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*.



Enfin, l'émergence des souches multirésistantes, doit amener les praticiens à mettre en œuvre les mesures d'hygiène susceptibles d'éviter leur dissémination (Nordmann et Poirel, 2002) et surtout inciter à l'usage prudent et à bon escient des antibiotiques sur la base de méthodes simples de détection des mécanismes de résistance (Vedel, 2005) et à la mise en place d'un programme national de surveillance.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Alekshun M. N., and S. B. Levy. (1997).** Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:2067-2075.

**Amazian K., Fendri C., Missoum M.F., Bouzouaia N., Rahal K., Savey A., Saadatian-Elahi M., Fabry J. (2006).** Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25 (5): 340-343

**Ambler R.P.(1980).** The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 289: 321-331.

**Ambler R.P., Coulson A.F.W., Frère J.M., Ghuysen J.M., Joris B., Forsman M., Levesque R.C., Tiraby G. and Waley S.G.(1991).** A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochemical Journal* ; 276 :269-272

**Aubert G., Carricajo A. (2005).** De l'antibiogramme à la prescription des antibiotiques. Laboratoire de Bactériologie. CHU-Hôpital de Bellevue. DESC. Réanimation médicale. <http://reamed.ujf-grenoble.fr/seminaires/archives/2005>

**Aubron C, Rapp C, Parienti J.J, Patey O. (2002).** Actualité de l'antibiothérapie inhalée dans les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*. *Méd Mal Infect* ; 32: 460-467.

**Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. Ed Ellipses.

**Batchelor F.R., Doyle F.P., Naylor J.H.N., Rolinson G.N. (1959).** Synthesis of penicillin : 6 aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* ;183 :257-258

**Bedos J.P. (2003).** Stratégies thérapeutiques dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation.* 22: 534-538.

**Bellido F., Veuthey C., Blaser J. et al. (1990).** Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother*; 25: 57-68.

**Ben jema Z, Mahjoubi, Ben Haj H'mida Y., Hammani N., Ben Ayed M., Hammani A. (2004).** Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la région de Sfax(1993-1998). *Pathologie Biologie* ;52 :82-88.

**Bert F., Briaud I., Branger C., Lambert-Zechovsky N.(1996).** Comparaison de l'activité des  $\beta$ -lactamines sur *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des phénotypes de résistance. *Pathol Biol* ;44 :329-32

**Bert F., Lambert-Zechovsky N(2000).** *Pseudomonas aeruginosa* :actualités sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques* ;2 :195-201

**Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V, Quentin G, Lambert N, Arlet G. (2003).** Evaluation of the Osiris Expert System for Identification of  $\beta$ -lactam Phenotypes in Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* P3712-3718.

- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B (2005).** Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol (Paris)*. 53(6):341-8
- Bertrand X., Blasco G., Belle E., Boillot A., Capellier G., Talon D. (2003).** Importance de la transmission croisée dans l'épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* en soins intensifs. *Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation*. 22: 505-509
- Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. (1998).** Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*. 4: 242-7.
- Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V., and Jadega L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis*. 5(2): 279-313
- Bradford P.A. (2001).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 14: 933-51.
- Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, Rolinson GN. (1976).** Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*;29(6):668-669.
- Bryskier A. (1999).** Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses.
- Bush K., Jacoby G. A., and Medeiros A. A. (1995).** A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation to molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39:1211-1233
- Cambau E., Perani E., Dib C., et al.(1995).** Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. *Antimicrob Agent. Chemother* ;39 :2248-52
- Campbell J.I., Cioufu O., Hoiby N.(1997).** *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis have different  $\beta$ -lactamase expression phenotype but are homogeneous in the ampC-ampR region. *Antimicrob Agent. Chemother* ;41 :1380-4.
- Carmeli Y., Troillet N., Eliopoulos GM, Samore MH.(1999).** Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : comparaison risks with different antipseudomonals agents. *Antimicrob Agent. Chemother*.43(6) :1379-82
- CA SFM. (2006).** Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>
- Cattoen C., Levent T., Grandbastien B., Descamps D., Bouillet L., Coignard B., Beaucaire G., réseau de microbiologistes de l'ARECLIN. (1999).** Observatoire régional *Pseudomonas aeruginosa* du Nord-Pas-de-Calais : données épidémiologique et microbiologiques. *Med Mal Infect*; 29 : 160-6

**Cattoir V. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Path Biol.* 52: 607-616.

**Cavallo J.D., Fabre R., Leblanc F., Nicolas-Chanoine MH., Thabaut A., and the GERPB (2000a).** Antibiotic susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa* : a french multicentre study (1996). *J. Antimicrob. Chemother.* 46 :133- 136

**Cavallo J.D., Leblanc F., Fabre R., GERPB (2000b).** Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines : étude GERPB 1998. *Pathol Biol* ;48:472-7

**Cavallo J.D., Leblanc F., Fabre R., Fourticq-Esqueoute A, GERPB. (2001).** Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux bétalactamines : étude GERPB 1999. *Pathol Biol.* 49: 534-9.

**Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E.(2004).** Bêtlactamines. *EMC-Maladies infectieuses.* 1 :129-202

**Cavallo JD, Hocquet D, Plésiat P, Fabre, Roussel-Delvallez M. (2007).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (5): 1021-1024.

**Chain E., Florey H.W., Gardner A.D., Heatley N.G., Jennings M.A., Orr-Ewing J., et Sanders A.G. (1940).** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, ii: 226-228.

**Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J, Fonzé E, Fraipont C, Frère J.M, Galleni M, Goffin C, Joris B, Lamotte-Brasseur J, Nguyen-Distèche M. (1998).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *medecine /science.* 14: 544-55.

**Chen H.Y., Yuan M., Livermore D.M.(1993).** Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.* ;43 :300-9

**Chopra, I. (1998).** Research and development of antibacterial agents. *Current Opinion in Microbiology.* 1 : 495-501.

**Courvalin P, Goldstein J, Philippon A, Sirot J. (1985).** Antibiogramme. *MPC Ed.* P225-235.

**Crespo M.P, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann E, Turton J, Glover J, Velez J.D, Castaneda C.R, Recalde M, Livemore M. (2004).** Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a novel Metallo- $\beta$ -lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J. Clin. Microbiol.* 42 (11): 5091-5101.

**Curtis N.A., Orr D., Ross G.W., Boulton M.G.(1979).** Competition of beta-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*:

comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother*;16(3):325-8.

**De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. (2002).** Prospective survey of  $\beta$ -lactamases produced by Ceftazidime Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46 (9): 3031-3034.

**Deplano A., Denis O., Poirel L., Hocquet D., Nonhoff C. Byl B. et al. (2005).** Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. clin. Microbiol*;43:1198-204.

**Doublet B. (2004).** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol *florR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat.

**European Antimicrobial Resistance Surveillance System,** <http://www.rivm.nl/earss>. Cited 24 Aug 2007

**Fisher J.F., Meroueh et al. (2005).** « Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics : compelling opportunism , compelling opportunity ». *Chem. Rev.* 105(2) :395-424

**Fleming A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in the isolation of *H. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 10: 226-236.

**Frère, J.-M., et Joris, B. (1985).** Penicillin sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*,11: 299-396.

**Galleni M, Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Fozze E, Amicosante G, Frere JM. (1995).** The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine beta-lactamases. *Biochem Pharmacol.* 11;49(9):1171-8.

**Ghuysen J.M. (1998).** Bacterial resistance to antibiotics, an exemplary model of directed molecular evolution. *Rev. Med. Liege.* 53(9):529-31

**Godfrey A. J., Bryan L. E., and Rabin H. R. (1981).** b-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:705-711

**Gotoh, N., K. Nunomura, and T. Nishino (1990).** Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:513-523

**Gotoh N, Itoh N, Tsujimoto H, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T. (1994).** Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.*; 122(3):267-273.

**Gotoh, N., H. Tsujimoto, M. Tsuda, K. Okamoto, A. Nomura, T. Wada, M. Nakahashi, and T. Nishino (1998).** Characterization of the MexC-MexD-OprJ

- multidrug efflux system in  $\Delta mexA$ - $mexB$ - $oprM$  mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1938-1943
- Grimont P.A.D (1998).** Taxonomie des *Pseudomonas*. *Méd. Mal. Infect.*, 28 (Spécial), 65-71.
- Grundman H., Kropec A., Harting D.(1993).** *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit : reservoirs and aetiology of the nosocomial pathogen. *J. Infect. Dis.* ;168 : 943-7.
- Hakenbeck R., Coyette J.(1998).** Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.*;54(4):332-40
- Hancock R.E.W.(1997).** Peptide antibiotic. *The Lancet*,349 :418-422
- Jacobs C., Huang L.J., Bartowsky E., Normark S., Park J.T(1994).** Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for  $\beta$ -lactamase induction. *EMBO J.* 13 :1684-1694.
- Jesudeason M.V, Kandathil A.J, Belaji V. (2005).** Comparaison of two methods to detect carbapenemase and metallo-  $\beta$ -lactamases production in clinical isolates. *Indian J Med Res.* 121. P780-783.
- Hamze M, Dabboussi F, Izard D. (2004).** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998-2001) au nord du Liban. *Méd Mal Infect.* 34: 321-324
- Hocquet D, Lianes C, Party I, El Garch F, Plésiat P. (2004).** Deux systèmes d'efflux exprimés simultanément chez des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*. *Path biol.* 52: 455-461.
- Howard M., Couptry A., Perez C. (1995).** Retrospective multicenter study of the vital blood culture system. Presented at the 95th General meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kado C.I, Liu S.T. (1981).** Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J.Bacteriology.* 145 (3): 1365-1373.
- Kalai S., Achour W., Abdeladhim A. Bejaoui M., Ben Hassen A.( 2005 ).** *Pseudomonas aeruginosa* isolés de patients immunodéprimés: résistance aux antibiotiques, sérotypage et typage moléculaire. *Medecine et Maladies infectieuses* ;35 :530-535.
- Kieser T.(1984).** Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12 :19-36
- Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Kahr AL, Pechère JC(1997).** Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;41:2540-3.

- Kohler T., Michea-Hamzehpour M., Epp FF, Pechere J.C.(1999).** Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contribution of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother*;43:424-7
- Kurokawa H., Yagi T., Shibata N., Shibayama K., Arakawa Y.,(1999).** Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* ; 354 :955
- Labia R. (1999).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases in *Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques*. Ed Ellipses. P:436-445.
- Lazdunski A. (1998).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* et leur régulation. *Méd. Mal. Infect.*, 28 (Spécial), 109-118.
- Lee K, Lim Y.S, Yong D, Yum J.H, Chong Y. (2003).** Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- $\beta$ -lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4623-4629.
- Le Noc P. (1999).** Monolactames in *Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques* . Ed Ellipses. P: 374- 391.
- Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy PH.(1995).** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother* ;39 ;185-91
- Li X-Z ,Livermore DM, Nikaido H.(1994).** Role of efflux pumps in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* : resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother* ;38 :1732-41
- Li X-Z, Nikaido H., and Poole K.(1995).** Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* ;39 :1948-1953
- Li, X.-Z., L. Zhang, and K. Poole.(1998).** Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-2991
- Livermore DM.(1992).** Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 :2046-2048
- Livermore, D.M.( 1995).**  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.
- Lodge J.M., Minchin S .D., Piddock L.J., Busby J.W.(1990).** Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. *Biochem J.* ;272(3):627-31.
- Lomovskaya O, Warren M.S, Lee A, Gallazo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee V.J. (2001).** Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* P105-116.



**Loureiro MM, Moraes BA, Quadra MRR, Pinheiro GS, Asensi MD. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* : study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* ; 97 : 387-94.

**Marchal N, Bourdon J.L, Richard C.L. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries. 3<sup>ème</sup> Ed Doin.

**Massova I, Mobashery S.(1998).** Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*;42(1):1-17.

**Masuda N., Sakagawa E., Ohya S. (1995).** Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(3):645-649

**Masuda N., Gotoh N., Ohya S., and Nishino T. (1996).** Quantitative correlation between susceptibility and Opr J production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 :909-913

**Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. (1999).** Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 400-402.

**Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. (2000).** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 3322-7.

**Medeiros A. A. (1997).** Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin. Inf. Diseases.* 24(Suppl 1):S19-S45.

**Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Eldere V, Glupczynsky Y, Laethem V, Jacobs F, Lebeque P, Malfroot A, Tulkens P.M, Van Bambeke F. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques.* 1-31.

**Monteil H. (2003).** En quoi le microbiologiste peut-il contribuer à l'amélioration de la qualité de l'antibiothérapie ? *Med mal infect.* 33: 1s-12s.

**Morin R.B., Jackson B.G., Flynn E.H. and Roeske R.W.(1962).** Chemistry of cephalosporin antibiotics. 7-aminocephalosporanic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 84:3400-3401

**Mouton Y, Bingen E, Deboscker Y, Dubreuil L. (2000).** Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux. Ed John Libbey Eurotext.

**Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A. et al.(1999).** Manual of clinical microbiology 7<sup>th</sup> edition Washington :ASM Press ;517-25

**Nakae T.(1995).** Role of membrane permeability in determining antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* ;39 :221-229

**Nauciel C, Vildé J.L. (2005).** Bactériologie médicale. Ed Masson.

**Neu H.C., Scully B.E. (1984).** Activity of cefsulodin and other agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*; 6 Suppl 3: S667-77.

**Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. (2003).** Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA* ; 289 : 885-888.

**Nguyen-Disteche M., Fraipont C., Buddelmeijer N., and Nanninga N. (1998).** The structure and function of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 309-316.

**Nikaido H., Nikaido K., Harayama S. (1991).** Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 15; 266(2): 770-9.

**Nikaido H. (1996).** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 178, 5853-9.

**Nikaido H. (1998).** Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* 1, 516-523.

**Noguchi H., Matsuhashi M., and Mitauhashi S. (1979).** Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 100: 41-49

**Nordmann P., Ronco E., Naas T., Duport C., Michel-Briand Y. and Labia R. (1993).** Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 37 : 962-969.

**Nordmann P, Guibert M. (1998).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 128-131.

**Nordmann P, Poirel L. (2002).** Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8 : 321-331.

**Nordmann P. (2003).** Mécanismes de résistance aux bêtalactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales françaises d'Anesthésie et Réanimation.* 22: 527-530.

**Pai H., Kim J.-W., Kim J., Lee J. H., Choe K. W., Gotoh N. (2001).** Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 480-484

**Pellegrino FL, Teixeira LM, Cavalho Md Mda G, et al. (2002).** Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin Microbiol* ; 40(7) : 2420-4

**Philippon LN., Naas A., Bouthors A.T., Barakett V., Nordmann P. (1997).** OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 : 2188-2195

- Philippon A. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* :phénotypes de résistance aux antibiotiques. *Med Mal Infect* ;28(Spécial) :134-49.
- Philippon A et Arlet G. (2006).**  $\beta$ -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel! *Ann Biol Clin.* 64 (1) : 37-51.
- Piddock L.J. (2006).** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19(2) :382-402.
- Pitt TL, Livermore DM, Miller G, Vatopoulos A, Legakis NJ. (1990).** Resistance mechanisms of multiresistant serotype O :12 *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Europe. *J Antimicrob Chemother*;26:319-28.
- Plésiat P, Ramos-Aires J, Péchère JC, Kohler T. (1998).** Systèmes d'efflux actifs chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Méd Mal Infect.* 28: 126-33.
- Poirel L. (2006).** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : Quelles perspectives ? XVIIe Congrès national de la SFHH – Nantes.
- Poole K., Krebs K., Mc Nally C., Neshat S. (1993).** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : evidence for involvement of an efflux operon. *J. bactriol.* 175 : 7363-7372
- Poole K. (1994).** Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 34(4):453–456
- Poole K., Tetro K., Zhao Q., Neshat S., Heinrichs D.E., and Bianco N. (1996).** Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* : mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2021-2028
- Prescott L.M., Harley J.P. and Klein D.A (1995).** Microbiology, 4th edn. Bangkok :WCB/Mc Graw-Hill
- Pucci, M. J., J. Boice-Sowek, R. E. Kessler, and T. J. Dougherty. (1991).** Comparison of cefepime, cefpirome, and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC8329. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:2312–2317.
- Quinn J. P., Dudek E. J., DiVincenzo C. A., Lucks D. A. & Lerner S. A. (1986).** Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Infectious Diseases* ;154 : 289-94.
- Rahal K. (2005).** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 7<sup>ème</sup> rapport d'évaluation. Institut Pasteur d'Algérie.
- Ramos Aires J., Köhler T., Nikaido H. et al. (1999).** Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agent Chemother* ;43 :2624-8
- Rio Y., Pina P., Jurin F., Allouch P., Didion J., Chardon H., Chiche D. (2002).** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques, isolés chez des malades de

soins intensifs français en 1998. Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines. Etude Escrime. *Pathol Biol* (Paris) ;50:12-7.

**Rodriguez -Villalobos H, Struellens M.J. (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*. 15:205-213.

**Rolinson G.N.(1998).** Forty years of  $\beta$ -lactams research. *J.Antimicrob. Chemother.* 41:589-603

**Ruimy R. (2003).** Etat actuel de la résistance bactérienne et principaux mécanismes en cause. Bacille à Gram négatif. Laboratoire de Bactériologie. Groupe Hospitalier Bichat-Claude-Bernard (GHBCB). [www.xbichat.jussieu.fr](http://www.xbichat.jussieu.fr).

**Sabath L.D., Jago M., et Abraham E.P. (1965).** Cephalosporinase and penicillinase activities of a B-lactamase from *Pseudomonas pyocyaneus* *Biochem. J.*;96: 739-752.

**Salyers A.A, Whitt D.D. (2002).** Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2<sup>nd</sup> edn. Washington, D.C.: *ASM Press. Chapter* ;16: 247-262

**Sambrook J, Russel D.W. (2001).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Ed CSHL PRESS. Vol 1.

**Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.(1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.

**Satake S., Yoshihara E. & Nakae T. (1990).** Diffusion of beta-lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 685-90

**Satake S., H. Yoneyama, and T. Nakae. (1991).** Role of OmpD2 and chromosomal  $\beta$ -lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:199-207

**Schwarz S, Spies U, Cardoso M. (1991).** Cloning and sequence analysis of a plasmid -encoded chloramphenicol acetyl transferase from *Staphylococcus intermedius*. *J. Gent. Microbiol.* 137: 977-981.

**Sécher I, Hermès I, Pré S, Carreau F, Bahuet F. (2005).** Cas groupes d'infections du site opératoire à *Pseudomonas aeruginosa* en orthopédie/traumatologie. *Méd Mal Infect.* 35: 149-154.

**Smith A.M., Botha R.F., Koornhof H.J., Klugman KP.(2001).** Emergence of a pneumococcal clone with cephalosporin resistance and penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* ;45 :2648-2650

**Song J., Xie G., Eif P.K., Young K.D., Jensen R.A.(1998).** Comparative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 7 in the context of its membership in the family of low-molecular-mass PBPs. *Microbiology.*;144 ( Pt 4):975-83

- Srikumar R., Li X.-Z. & Poole, K. (1997).** Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **179**, 7875–81.
- Srikumar R., Kon T., Gotoh N. & Poole K. (1998).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 65–71
- Sykes RB., et Matthew M. (1976).** The B-lactamase of Gram-negative bacteria and their role in resistance to O-lactam antibiotics. 3. *Antimicrob. Chemother.*, 2:115-157.
- Tang H., Kays M., and Prince A. (1995).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* ;63: 1278–1285
- Tankovic J. (2000).** Mécanismes d'action des antibiotiques. Précis de bactériologie clinique. Edition Eska. P: 584-595
- Tichat K.A. (1995).** Caractérisation des  $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries. Thèse de magister.
- Trias J., Dufresne J. Levesque R. C., and. Nikaido H. (1989).** Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1201-1206.
- Trias J., and Nikaido H.(1990a).** Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenem and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 :52-57
- Trias J., and. Nikaido H.( 1990b).** Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* 265:15680-15684
- Vedel G. (2005).** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 657-664.
- Watanabe M., Iyobe S. , Inoue M. et al(1991).** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 35 : 147-51.
- Watine J., Charet JC, Bruel A., Bouilloux JP, Palliez J. (1996).** Usefulness of a computerized expert system associated with systematic O-serotyping for the early detection of outbreaks of hospital acquired infections and for presumptive antibiotic therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Pathol. Biol.* ; 44 :125-31
- Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. (1983).** The clinical significance of positive blood cultures. A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.*;5 (1) : 35-52 .

**Weldagen GF, Poirel L, Nordmann P. (2003).** Ambler class A extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 2385-92.

**Wong K. K., Poole K., Gotoh N, and Hancock R. E. W.. (1997).** Influence of OprM expression on multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2009-2012

**Woods D.E. , Vasil M.L. (1994).** Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Treatment, pp. 21–50. Edited by A. L. Baltch & R. P. Smith. New York: Marcel Dekker

**Yang Y., Bhachech N, and Bush K. (1995).** Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem : permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 35 :75-84

**Yoshida T., Muratani T., Iyobe S., et al. (1994).** Mechanisms of high-level resistance to quinolones in urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 38 :1466-9

**Yoshimura F, Nikaido H. (1982).** Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol.* 152(2):636–642.

**Zhao Q., Li XZ, Srikumar R., Poole K. (1998).** Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob. Agents Chemother* ;42 : 1682-1688

# **ANNEXES**

## Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de la Galerie API 20NE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS / ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO3	potassium nitrate	réduction des Nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2 / 5 min	
			incolore	rose-rouge
		réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 mn	
			rose	incolore
TRP	L-tryptophane	formation d'indole	James / immédiat	
				incolore / vert pale / jaune
GLU	D-glucose	fermentation	beu à vert	jaune
ADH	L-arginine	Agrinine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	uréase	jaune	Orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophénil- $\beta$ D-galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	incolore	Jaune
GLU ARA MNE MAN NAG MAL GNT CAP ADI MLT CIT PAC	D-glucose L-arabinose D-mannose D-mannitol N-acétyl-glucosamine D-maltose potassium gluconate acide caprique acide adipique acide malique trisodium citrate acide phénylacétique	assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation assimilation	transparence transparence transparence transparence transparence transparence transparence transparence transparence transparence transparence	trouble trouble trouble trouble trouble trouble trouble trouble trouble trouble trouble





**Annexe 3. Valeurs critiques des antibiotiques utilisés pour  
*Pseudomonas aeruginosa* (CA SFM, 2006)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque µg	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)		
			S	R	S	R	
<b>Béta-lactamines</b>	Ticarcilline	TIC	75	≤16	>64	≥22	<18
	Ticarcilline + acide clavulanique	TCC	75/10	≤16/2	>64/2	≥22	<18
	Pipéracilline	PIP	75	≤16	>64	≥18	<12
	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	75/10	≤16/4	>64/4	≥19	<14
	Cloxacilline	OX	5	2	2	20	20
	Imipénème	IPM	10	≤4	>8	≥22	<17
	Aztréonam	ATM	30	≤4	>32	≥23	<17
	Céfotaxime	CTX	30	≤4	>32	≥21	<15
	Ceftazidime	CAZ	30	≤4	>32	≥21	<15
	Céfopérazone	CFP	30	≤4	>32	≥21	<14
	Cefsulodine	CFS	30	≤8	>32	≥22	<14
	Céfépime	FEP	30	≤4	>32	≥21	<15
	Cefpirome	CPO	30	≤4	>32	≥21	<15
Moxalactam	MOX	30	≤4	>32	≥23	<17	
<b>Aminosides</b>	Tobramycine	TM	10	≤4	>8	≥16	<14
	Amikacine	AN	30	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamicine	GM	15	≤4	>8	≥16	<14
<b>Fluoroquinolone</b>	Ciprofloxacine	CIP	5	≤1	>2	≥22	<19

**Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin et al., 1991)**

<b>Solution initiale (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Solution mère (ml)</b>	<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>Concentration obtenue (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Concentration finale dans le milieu (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	2,3	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

**Annexe 5. Solution et tampon pour le test iodométrique (Courvalin et al., 1985)**

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>	
<b>Solution iodo-iodurée</b>	Iode	1 g
	Iodure de sodium	27 g
	Eau	50 ml
<b>Tampon phosphate 0.5 M pH 7</b>	Solution A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 68,08 g/l)	39 ml
	Solution B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 89,70 g/l)	61 ml

**Annexe 6. Solution et tampon pour l'extraction de l'ADN plasmidique  
(kado et Liu., 1981)**

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>	
<b>Solution de lyse</b>	SDS (Sigma)	3%
	Tris (Sigma)	50 mM pH 12,6
<b>Tampon TE</b>	Tris	50 mM
	EDTA (Sigma)	10 mM

**Annexe 7. Solution et tampon pour l'électrophorèse de l'ADN plasmidique  
(Sambrook et Russel., 2001)**

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>
<b>Tampon TBE 5X</b>	Tris base 54 g
	Acide borique 27,5 g
	EDTA 0,5 M 2 ml
	Eau distillée qsp 1 litre
<b>Tampon de charge</b>	Glycérol 3 ml
	Bleu de bromophénol 75 mg
	Eau distillée 7 ml

## Annexe 8. Amplification aléatoire : RAPD

### 1. Extraction rapide d'ADN : Boiling

Recueillir 4-5 colonies d'une culture d'une nuit sur gélose  
 Les introduire dans 100µl d'EDS, bien homogénéiser  
 Faire bouillir 15mn puis refroidir 10mn dans la glace  
 Centrifuger 5mn à 13000g  
 Recueillir le surnageant et le conserver à 4°C ou à -20°C

### 2. Composition du mélange réactionnel

Concentration finale :

Tampon Taq 1X, MgCl<sub>2</sub> 4mM, amorce 1µM, dNTP 0,5 mM, Taq polymérase 1,25U

Soit :

Tampon Taq 10X	5µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	8µl
Amorce 10µM	5µl
4dNTP (10mM)	1,25µl
Taq 5U/µl	0,25µl
EDS	25,5µl
Volume	45µl
ADN	5µl
Volume total	50µl

Amorces utilisées :

272 : 5'- AGC GGG CCA A-3'

AP5 : 5'- TCC CGC TGC G -3'

### 3. Programme d'amplification

94°C 4mn

94°C 30 sec

36°C 30 sec

72°C 3mn

4°C

Programme : 2h40 dans thermocycleur eppendorf

### 4. Electrophorèse :

Gel à 2% dans TBE 0,5X

Dépôt : 10 µl produit d'amplification + 2 µl tampon de charge

Migration : 100 volts 3h

Coloration 30mn au BET (0,5µg/ml), rinçage 1h à 4°C, refaire un lavage.

TBE 5X : Tris Base	54g
Ac borique	27,5g
EDTA 0,5 M pH 8	20ml
Qsp ED	1000ml

**Annexe 9. Nombre de prélèvements effectués dans chaque service**

	Nombre de prélèvements	Nombre de souches isolées(%)
Réanimation	188	92(48,9)
Neurochirurgie	133	54(40,6)
Traumatologie	124	46(37,1)
Chirurgie	100	40(40)
Divers	51	23(45,1)
Total	596	255(42,8)



Annexe 10. Tableau des valeurs de CMI (mg/L)

Souche	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXT	CAZ	FEP	ATM	IMP	Mecanisme	GEN	TOB	AMI	CIP
P1	NC	16	16	4	4	8	1	1	4	4	Sauvage	2	1	2	2
P2	NC	8	8	2	2	4	1	1	2	4	Sauvage	0	1	0,5	1
P3	NC	16	16	4	4	16	1	2	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P4	NC	16	16	2	2	8	1	1	2	8	OprD	256	4	1	0,25
P5	NC	8	8	2	2	8	1	1	4	8	OprD	256	4	1	0,25
P6	NC	64	32	16	8	8	0,5	2	2	4	Pase	>512	8	64	0,25
P7	NC	8	8	2	2	4	1	1	4	8	OprD	128	4	1	0,25
P8	R	32	64	64	32	128	8	8	8	4	Case	1	0,25	1	0,25
P9	R	16	16	4	4	8	2	2	4	4	Sauvage	4	1	4	0,25
P10	R	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	4	0,25
P11	C	64	128	128	128	>512	32	32	32	8	Case + OprD	4	1	8	0,25
P12	D	16	16	4	4	8	1	2	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P13	D	8	8	2	2	8	2	1	2	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P14	CCI	16	16	4	4	16	2	4	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P15	CCI	16	16	4	4	8	1	2	4	4	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P16	CB	16	16	2	2	8	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P17	CA	64	64	8	8	64	4	8	32	16	AB + OprD	4	2	4	4
P18	NC	8	8	1	2	8	1	1	2	8	OprD	>512	256	2	0,25
P19	NC	16	16	2	2	16	1	1	2	8	OprD	256	4	2	0,25
P20	NC	8	8	1	2	4	0,5	1	2	8	OprD	128	4	2	0,25
P21	NC	128	128	8	8	64	4	4	16	4	AB	1	0,5	1	0,5
P22	NC	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	2	0,25
P23	D	16	16	4	4	8	1	2	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P24	NC	64	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	2	0,25
P25	D	32	32	4	4	16	1	2	8	4	AB	2	1	2	0,25
P26	D	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	2	1	4	0,25
P27	T	>512	256	256	128	>512	64	32	32	4	Case	64	4	32	0,25
P28	T	64	16	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	0,5	2	0,25
P29	NC	16	8	2	2	8	0,5	1	2	8	OprD	512	128	1	0,25
P30	NC	16	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	OprD	256	4	1	0,25
P31	NC	16	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	OprD	128	4	2	0,25
P32	D	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	2	0,25
P33	D	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	2	1	2	0,25
P34	NC	16	8	4	2	8	0,5	0,5	2	8	OprD	256	4	1	0,25
P35	T	32	16	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	0,5	2	0,25
P36	CCI	64	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	4	1	4	0,25
P37	CCI	128	64	32	16	32	1	8	4	4	OXA10	256	128	512	4
P38	T	16	8	2	2	4	0,5	0,5	2	16	OprD	128	4	1	0,25
P39	T	16	8	2	2	8	1	1	2	8	OprD	1	0,5	2	0,25
P40	CCI	64	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	4	0,25
P41	CCI	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	4	0,25
P42	T	16	16	4	4	16	2	1	4	4	Sauvage	0,5	0,5	1	0,25
P43	T	128	128	8	8	64	2	8	16	4	AB	1	1	8	0,5
P44	D	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	0,5	2	0,25
P45	CCI	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	0,5	0,5	1	0,25
P46	D	64	64	8	8	32	2	4	8	4	AB	0,25	1	4	0,25
P47	D	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	0,5	2	0,25
P48	NC	32	32	4	4	16	2	2	8	2	AB	1	1	2	0,25

Sauche	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXI	CAZ	REP	ATM	IMP	Mécanisme	GEN	TOB	AMI	OIP
P49	NC	32	32	4	4	16	2	2	8	2	AB	0,5	0,5	2	0,25
P50	D	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	1	2	0,25
P51	D	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	1	4	0,25
P52	NC	32	32	4	4	16	2	2	8	2	AB	1	1	2	0,25
P53	CCI	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	0,5	0,5	1	0,25
P54	CA	32	32	8	8	32	2	4	8	4	AB	1	1	4	0,25
P55	T	8	8	4	4	8	1	1	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P56	T	8	8	4	2	4	1	1	2	8	OprD	128	4	1	0,25
P57	R	64	64	16	16	64	4	8	32	4	AB	2	0,5	2	1
P58	R	128	128	16	16	64	4	16	32	4	AB	2	0,5	4	0,5
P59	T	8	8	2	4	16	1	8	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P60	CCI	32	32	8	8	16	2	2	8	4	AB	2	1	4	0,25
P61	CCI	16	16	8	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P62	CCI	16	16	8	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P63	CCI	16	16	8	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P64	CCI	16	16	4	4	8	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P65	CCI	32	32	8	4	16	2	2	8	4	AB	2	1	4	0,25
P66	D	16	16	8	4	16	2	2	4	4	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P67	T	8	8	4	4	8	1	1	4	16	OprD	512	8	1	0,25
P68	NC	64	64	16	16	64	4	8	32	4	AB	2	0,5	4	0,5
P69	T	8	8	4	2	8	1	1	2	8	OprD	128	2	2	0,25
P70	T	8	8	4	2	8	1	1	4	16	OprD	256	4	2	0,25
P71	T	8	8	4	2	8	1	1	4	16	OprD	256	4	1	0,25
P72	NC	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	OXA10 + TEM110	>512	8	64	0,25
P73	CCI	128	128	16	16	64	4	8	32	4	AB	4	2	4	0,25
P74	CCI	64	64	8	8	16	2	4	8	2	AB	1	0,5	2	0,25
P75	D	16	16	4	4	8	1	2	4	4	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P76	D	16	16	8	4	16	1	2	4	4	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P77	D	64	64	64	64	512	16	8	16	2	Case	1	0,25	1	0,25
P78	NC	128	128	16	16	64	4	4	16	4	AB	2	0,5	2	0,5
P79	NC	32	32	8	4	16	2	2	8	4	AB	2	0,5	2	0,25
P80	NC	8	8	2	2	4	1	1	1	8	OprD	512	4	2	0,25
P81	R	32	32	8	8	32	2	2	8	8	AB + OprD	2	0,5	4	0,25
P82	T	16	16	2	2	8	1	1	1	16	OprD	256	4	1	0,25
P83	R	128	128	16	16	64	4	8	32	16	AB + OprD	2	0,5	2	4
P84	NC	8	8	2	2	4	1	1	1	8	OprD	128	4	1	0,25
P85	T	32	32	8	8	32	4	4	8	1	AB	2	1	4	0,25
P86	T	32	32	4	4	16	2	2	8	4	AB	1	0,5	2	0,25
P87	D	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P88	NC	>512	128	64	32	8	1	4	4	4	OXA10 + TEM110	>512	8	64	0,25
P89	NC	8	8	2	2	8	0,5	0,5	2	8	OprD	256	4	2	0,25
P90	R	128	128	16	16	64	4	8	32	16	AB + OprD	4	1	4	4
P91	R	32	32	4	4	16	2	2	8	8	AB + OprD	2	0,5	4	0,25
P92	NC	8	8	2	2	4	1	1	2	8	OprD	256	1	1	1
P93	CCI	64	64	8	8	64	4	4	32	4	AB	1	0,5	2	0,25
P94	CB	16	16	4	4	8	1	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P95	CCI	16	16	2	2	8	1	1	4	2	Sauvage	1	0,25	1	0,25
P96	NC	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	256	2	1	0,25
P97	T	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	128	2	1	0,25
P98	T	8	8	2	2	8	1	1	2	2	Sauvage	128	2	1	0,25
P99	D	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25

## Annexes

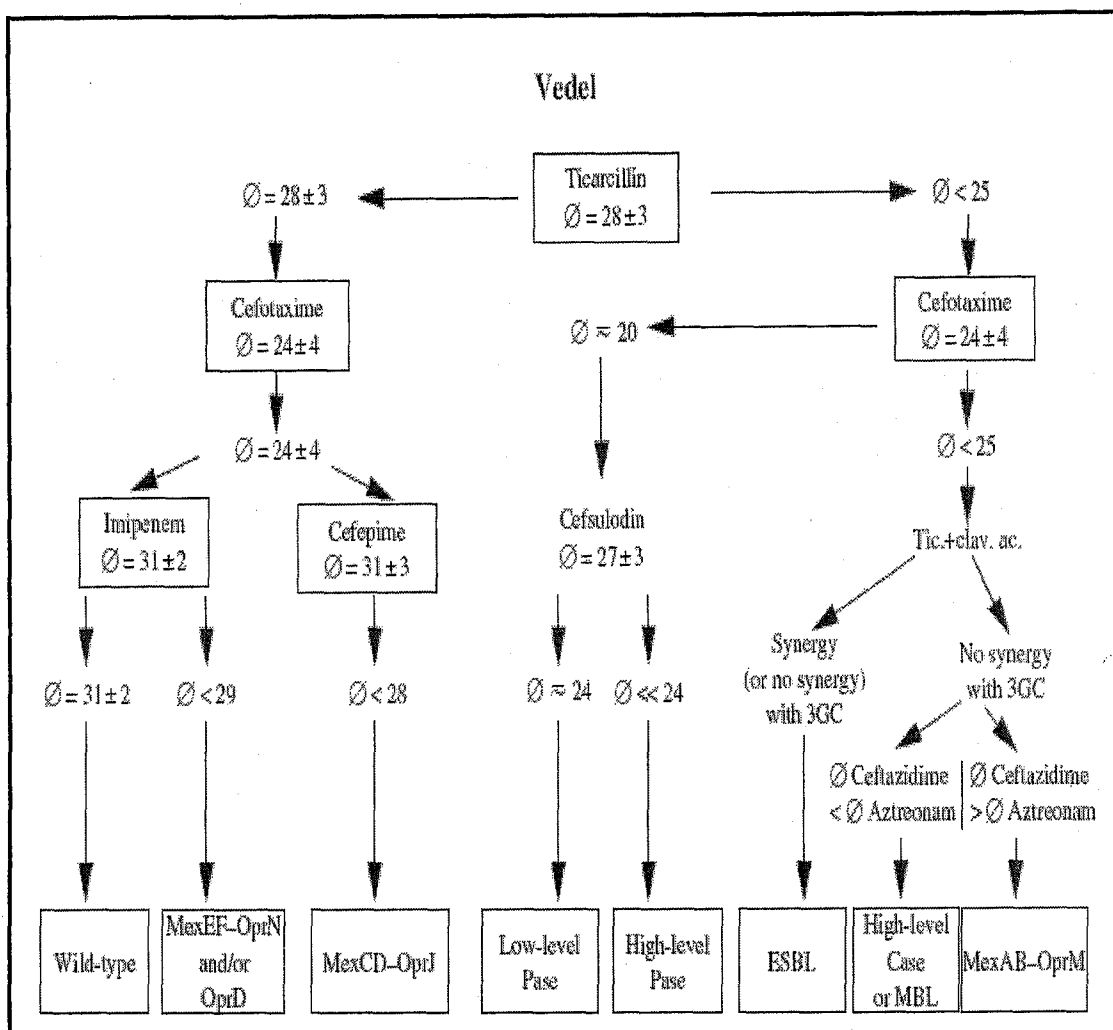
Souche	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXT	CAZ	FEP	ATM	IMP	Mécanisme	GEN	TOB	AMI	CIP
P100	T	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	128	2	1	0,25
P101	T	8	8	2	2	4	0,5	1	2	2	Sauvage	128	2	1	0,25
P102	T	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P103	D	128	128	8	8	64	4	8	32	2	AB	2	0,5	2	4
P104	NC	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	256	2	1	0,25
P105	NC	8	8	2	2	4	1	1	2	16	OprD	1	0,25	1	2
P106	T	8	8	2	2	8	1	1	2	1	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P107	T	16	16	2	2	8	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P108	NC	>512	256	128	32	16	1	4	4	2	OXA10 + TEM110	>512	8	64	0,25
P109	R	16	16	4	4	16	2	2	4	4	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P110	NC	64	256	32	32	512	32	16	32	1	Case	2	1	4	0,25
P111	T	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	OprD	1	0,5	1	0,25
P112	R	8	8	2	2	4	1	1	2	8	OprD	128	2	1	0,25
P113	D	8	8	2	2	8	1	1	4	8	OprD	256	2	2	0,25
P114	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P115	T	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	OprD	1	0,5	2	0,25
P116	NC	8	8	2	2	8	0,5	1	2	8	OprD	256	4	2	0,25
P117	R	8	8	2	2	8	1	1	2	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P118	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P119	R	16	16	4	4	16	2	2	8	4	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P120	NC	16	16	2	2	8	1	2	4	2	Sauvage	256	4	1	0,25
P121	T	32	32	8	8	32	4	4	8	2	AB	2	1	4	0,25
P122	NC	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	256	4	1	0,25
P123	NC	16	16	4	4	16	2	2	4	16	OprD	1	0,5	2	0,25
P124	T	32	32	16	16	64	4	4	8	2	AB	2	2	4	0,25
P125	R	64	64	16	16	64	4	8	32	1	AB	2	2	4	1
P126	CCI	16	16	4	4	8	1	2	4	2	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P127	T	16	16	2	2	8	1	1	4	8	OprD	>512	16	2	0,25
P128	NC	8	8	2	2	8	0,5	1	2	4	Sauvage	256	4	2	0,25
P129	NC	8	8	2	2	4	0,5	1	2	8	OprD	256	4	2	0,25
P130	R	8	8	2	2	8	0,5	1	4	8	OprD	>512	128	2	0,25
P131	R	8	8	2	2	8	0,5	2	2	4	Sauvage	>512	4	2	0,25
P132	R	64	64	8	8	64	4	8	32	1	AB	1	0,5	2	0,5
P133	R	16	16	4	4	8	1	2	4	1	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P134	CCI	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P135	NC	8	8	2	2	16	1	1	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P136	NC	16	16	2	2	16	1	1	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P137	CCI	64	64	16	16	64	8	32	16	2	Case	4	2	4	0,5
P138	R	16	16	8	8	32	1	4	2	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P139	D	32	32	16	16	64	2	4	8	2	AB	2	1	4	0,25
P140	NC	8	8	2	2	8	1	1	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P141	R	>512	64	128	32	16	2	4	4	2	OXA10 + TEM110	>512	8	128	0,25
P142	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	2	0,5	0,25
P143	NC	16	16	4	4	16	2	4	4	16	OprD	2	0,5	4	0,25
P144	R	16	16	2	2	16	1	4	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P145	R	>512	128	128	32	16	2	4	4	2	Pase	>512	16	128	0,25
P146	T	16	16	4	4	16	2	4	4	1	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P147	T	16	16	4	4	16	2	4	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P148	T	>512	64	128	16	16	2	2	4	2	Pase	>512	8	64	0,25
P149	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P150	R	16	16	4	4	8	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25

Souche	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXT	CAZ	FEP	ATM	IMP	Mécanisme	GEN	TOB	AMI	CIP
P151	R	16	16	4	4	16	1	4	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P152	T	16	16	4	4	16	1	4	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P153	T	16	16	4	4	8	1	2	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P154	R	8	8	4	4	8	1	8	2	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P155	D	16	16	4	4	8	1	2	4	8	OprD	256	4	2	0,25
P156	R	16	16	4	4	16	1	4	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P157	CCI	64	64	16	16	64	4	32	32	4	AB	2	0,5	4	0,25
P158	NC	>512	128	128	32	32	2	2	4	16	Pase + OprD	>512	16	128	0,25
P159	R	>512	128	128	32	16	2	2	4	16	Pase + OprD	>512	16	128	0,25
P160	R	>512	128	128	32	16	2	4	4	2	TEM110 + ?	>512	16	128	0,25
P161	R	>512	128	128	32	8	2	4	2	4	OXA10 + TEM110	512	8	64	1
P162	R	256	64	64	32	16	2	4	4	2	OXA10	256	8	128	0,25
P163	T	16	16	4	4	16	2	4	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P164	T	16	16	4	4	16	1	4	4	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P165	T	64	64	4	4	32	2	4	16	2	AB	2	0,5	2	0,5
P166	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P167	R	64	64	8	8	64	4	8	32	2	AB	2	0,5	2	0,5
P168	R	>512	128	128	32	16	2	4	4	4	Pase	512	8	128	1
P169	D	64	128	64	32	512	32	16	8	2	Case	2	0,5	2	0,25
P170	T	16	16	4	4	16	2	4	4	2	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P171	R	64	64	8	8	64	4	8	32	2	AB	2	0,5	2	0,5
P172	R	>512	64	128	32	16	2	4	4	2	OXA10 + TEM110	>512	8	128	0,5
P173	R	>512	128	128	32	8	2	4	4	4	Pase	>512	8	128	1
P174	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P175	NC	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P176	R	>512	256	512	128	512	32	16	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	1
P177	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P178	R	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	1
P179	R	>512	128	128	32	16	1	4	4	2	OXA10 + TEM110	>512	8	128	0,25
P180	R	>512	256	>512	128	>512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	1
P181	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P182	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P183	R	>512	256	512	128	512	16	16	32	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	1
P184	R	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	1
P185	R	>512	256	512	128	>512	64	32	16	32	Case + OXA10 + TEM110 + OprD	>512	8	128	1
P186	R	>512	256	>512	128	512	16	8	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,25
P187	R	>512	256	256	64	256	16	8	8	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,25
P188	R	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	1
P189	R	>512	256	512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	1
P190	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	1	0,5	4	0,25
P191	R	64	128	128	128	512	16	16	16	32	Case + OprD	2	1	2	0,5
P192	R	>512	256	>512	256	>512	64	64	64	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P193	R	>512	256	512	128	>512	32	16	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P194	R	16	16	4	4	16	1	2	4	2	Sauvage	2	0,5	4	0,25
P195	R	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P196	R	16	16	4	4	16	2	2	4	2	Sauvage	2	0,5	2	0,25
P197	R	>512	256	256	32	16	1	2	4	16	Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P198	R	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	256	0,5
P199	R	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + OXA10 + TEM110 + OprD	>512	8	128	0,5
P200	R	>512	256	256	64	16	4	2	8	32	Pase + OprD	>512	16	256	0,5

Source	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXT	CAZ	FEP	ATM	IMP	Mécanisme	GEN	TOB	AMI	CIP
P201	R	>512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	32	256	0,5
P202	R	>512	256	512	128	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P203	R	>512	256	>512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P204	R	>512	256	>512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	64	0,5
P205	R	>512	256	>512	128	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P206	R	>512	256	>512	256	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P207	R	512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	128	4	32	0,5
P208	R	>512	256	>512	256	512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P209	R	>512	256	>512	512	>512	128	64	64	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P210	R	512	256	512	128	512	32	32	16	32	Case + Pase + OprD	128	4	32	0,5
P211	R	>512	256	>512	128	512	32	16	16	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5
P212	CCI	16	16	4	4	16	1	1	2	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P213	T	16	16	4	4	8	2	0,5	2	4	Sauvage	2	1	4	0,25
P214	NC	16	16	4	4	16	1	1	2	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P215	CCI	16	16	4	4	16	1	1	2	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P216	CCI	16	16	4	4	8	1	2	2	2	Sauvage	2	1	4	0,25
P217	CB	16	16	4	4	8	1	2	4	8	OprD	>512	256	4	0,25
P218	CA	64	128	32	32	512	16	4	16	4	Case	2	1	4	0,25
P219	R	64	256	256	128	512	32	32	32	32	Case + OprD	2	1	4	8
P220	R	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5
P221	R	128	256	256	128	512	16	32	32	32	Case + OprD	2	1	4	8
P222	R	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P223	R	>512	512	>512	256	>512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P224	R	128	256	256	128	>512	16	32	16	32	Case + OprD	2	1	4	8
P225	R	>512	512	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5
P226	T	16	16	4	4	16	1	2	2	4	Sauvage	1	0,5	2	0,5
P227	T	16	16	4	4	16	1	2	2	4	Sauvage	1	0,5	2	0,5
P228	CCI	16	16	2	2	8	0,5	1	2	2	Sauvage	1	2	2	0,25
P229	CA	16	16	4	4	16	1	1	2	4	Sauvage	1	0,5	1	0,5
P230	R	128	256	256	128	512	16	32	16	32	Case + OprD	1	2	2	8
P231	T	16	16	4	4	16	1	1	2	2	Sauvage	2	2	1	0,5
P232	NC	16	16	2	2	8	1	0,5	2	4	Sauvage	1	0,5	1	0,5
P233	CB	16	16	4	4	16	0,5	1	2	4	Sauvage	256	256	4	0,5
P234	CB	16	16	4	4	16	1	0,5	2	4	Sauvage	1	0,5	1	0,25
P235	R	>512	512	>512	256	>512	32	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	16	256	0,5
P236	R	128	256	256	128	512	16	32	16	32	Case + OprD	1	2	2	>16
P237	R	128	256	256	128	>512	16	32	16	32	Case + OprD	1	2	2	8
P238	NC	512	256	512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	128	4	32	0,5
P239	NC	>512	256	>512	64	256	16	16	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,25
P240	NC	>512	256	>512	256	>512	64	32	32	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5
P241	NC	>512	256	>512	128	>512	16	16	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	128	0,5
P242	NC	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	16	32	0,5
P243	R	>512	512	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5
P244	CCI	16	16	4	4	16	0,5	1	2	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P245	CA	16	16	4	4	16	1	1	2	16	OprD	2	0,5	4	0,25
P246	CA	16	16	2	2	8	1	0,5	1	4	Sauvage	2	2	4	0,5
P247	T	16	16	2	2	8	1	0,5	1	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P248	T	16	16	4	4	16	0,5	1	2	2	Sauvage	1	0,5	2	0,25
P249	T	16	16	2	2	8	1	0,5	2	4	Sauvage	1	0,5	1	0,25
P250	T	256	128	64	32	32	1	4	8	4	Pase	512	4	32	0,25
P251	NC	16	16	4	4	16	0,5	0,5	2	4	Sauvage	2	1	2	0,5

Souche	Service	TIC	TCC	PIP	TZP	CXT	CAZ	PEP	ATM	IMP	Mécanisme	GEN	TOB	AMI	CIP
P252	CCI	16	16	4	4	16	1	0,5	2	2	Sauvage	1	0,5	1	0,25
P253	R	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	8	4	0,5
P254	R	64	64	16	16	32	4	4	16	4	AB	2	0,5	2	0,5
P255	R	>512	256	>512	128	512	16	32	16	32	Case + Pase + OprD	>512	8	128	0,5

**Annexe 11a. Diagramme de détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* (Vedel, 2005)**



**Ø: diamètre**

**Case: céphalosporinase**

**Pase: pénicillinase**

**ESBL: bêtalactamase à spectre élargi**

**MBL: métallobêtalactamase**

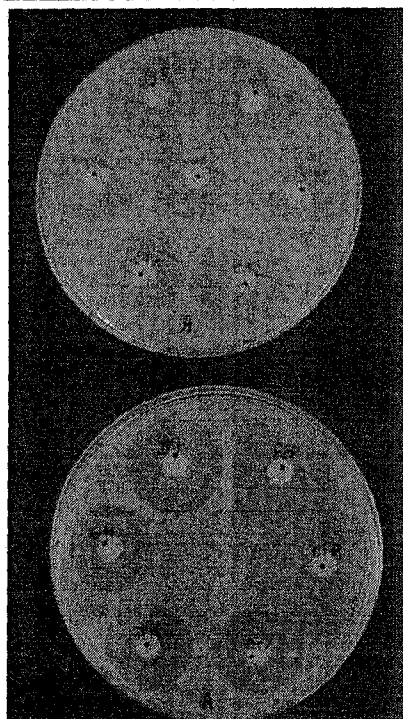
**Annexe 11b . Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et mécanismes de résistance (Nordmann, 2003)**

	<b>Pénicillinase</b>	<b>Céphalosporinase hyperproduite</b>	<b>BLSE</b>	<b>Carbapénémase</b>	<b>Efflux (OprM)</b>	<b>Perte OprD</b>
<b>Ticarcilline</b>	R	R	R	R	I	S
<b>Pipéracilline + tazobactam</b>	I/S	R	S	R	S	S
<b>Ceftazidime</b>	S	I/R	R	R	S	S
<b>Céfépime</b>	S	I	R	R	I/S	S
<b>Imipénème</b>	S	S	S	R	S	R

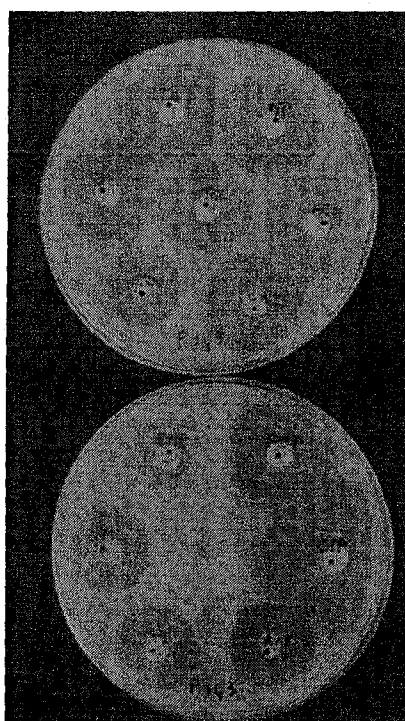


**Annexe 12. Résultats d'antibiogramme**

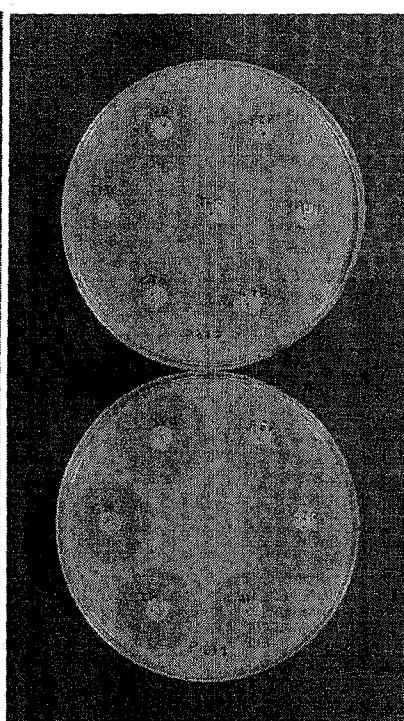
**12a. Phénotypes de résistance non enzymatique aux  $\beta$ -lactamines**



**ATCC 27853**

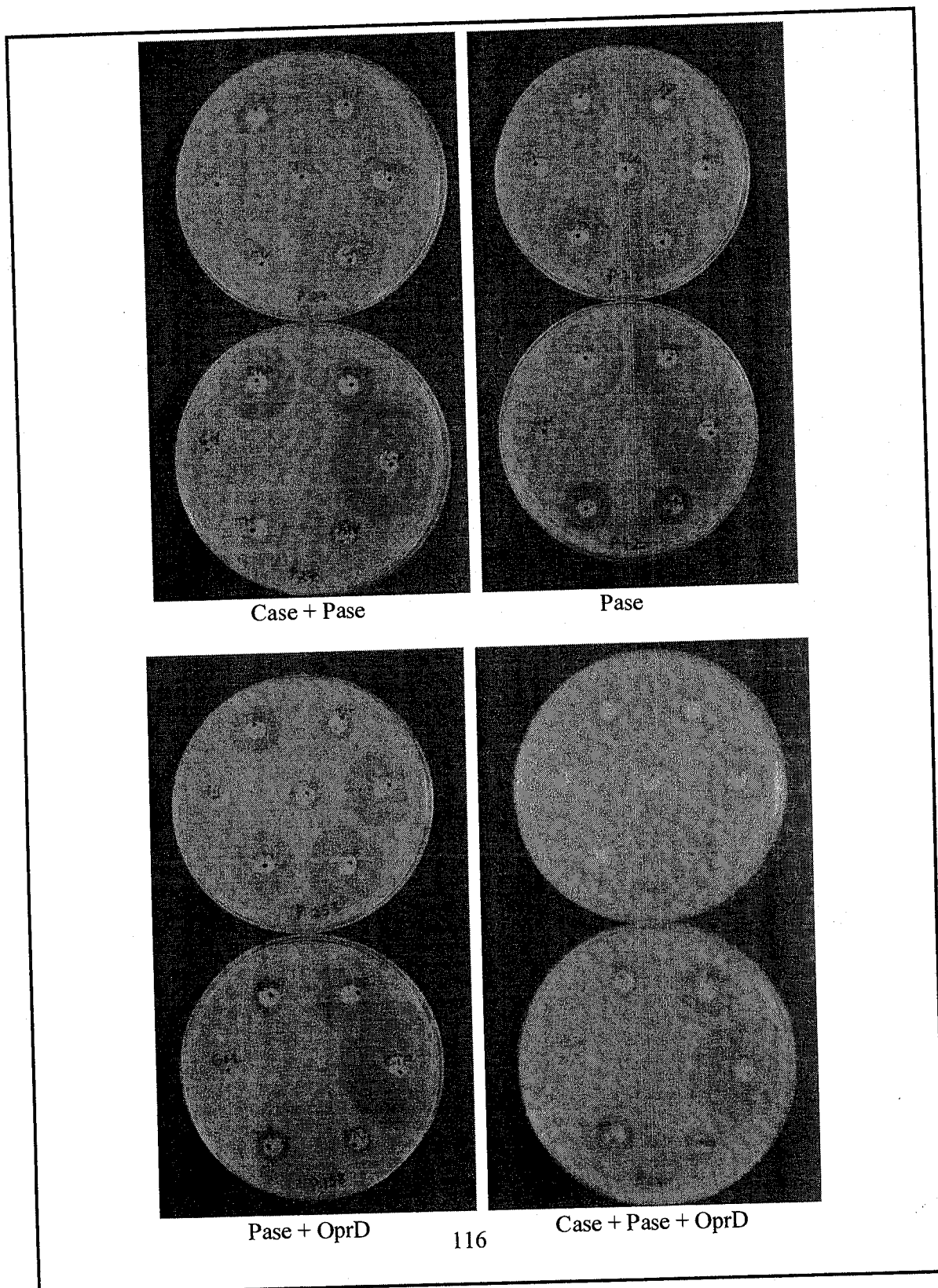


**Perte OprD**



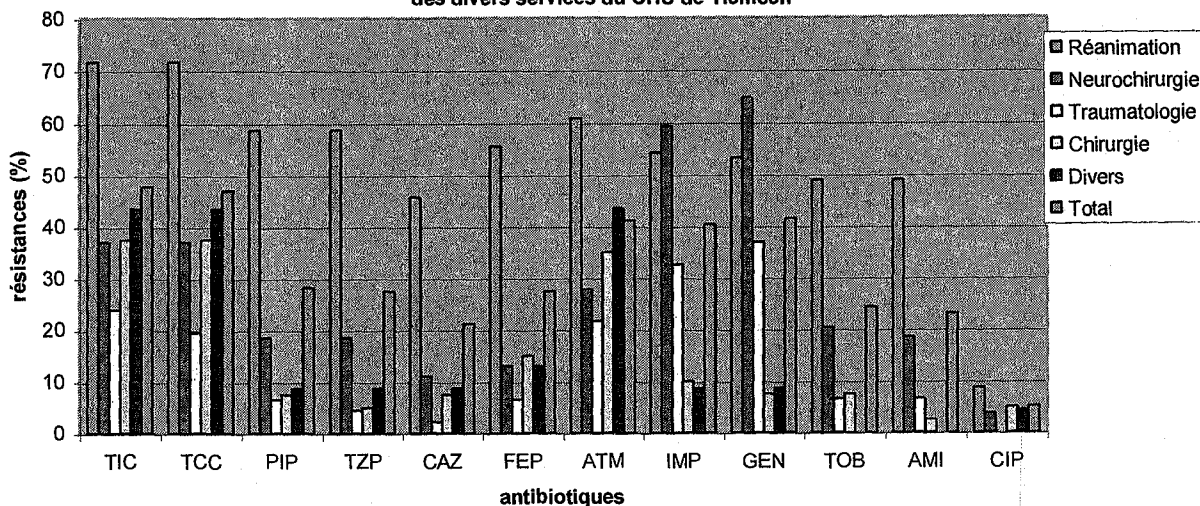
**Efflux MexAB-OprM**

12b. Phénotypes de résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines



**Annexe 13. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa***

**Figure 13a. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau des divers services du CHU de Tlemcen**



**Figure 13b. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du service de réanimation**

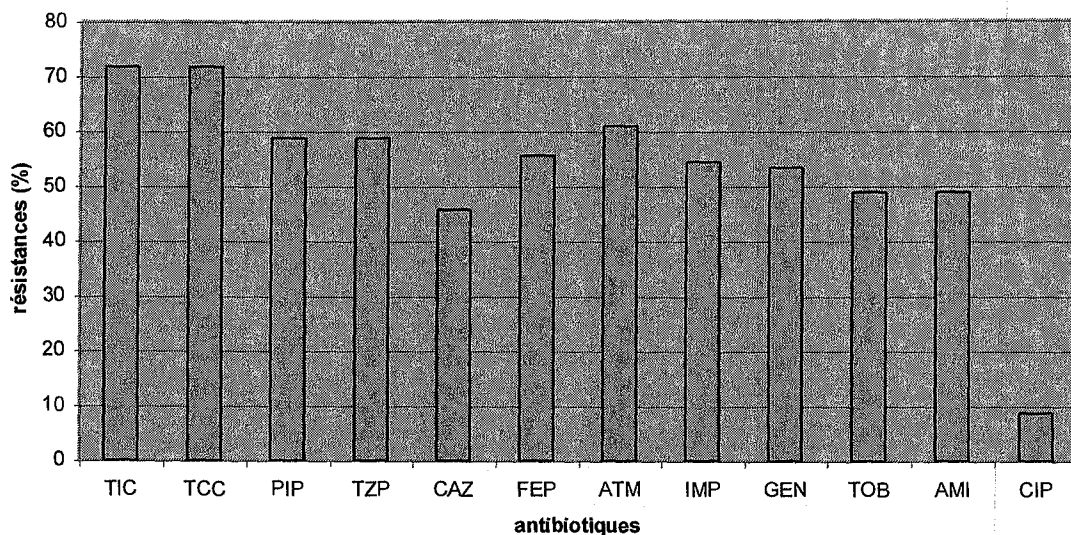


Figure 13c. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du service de neurochirurgie

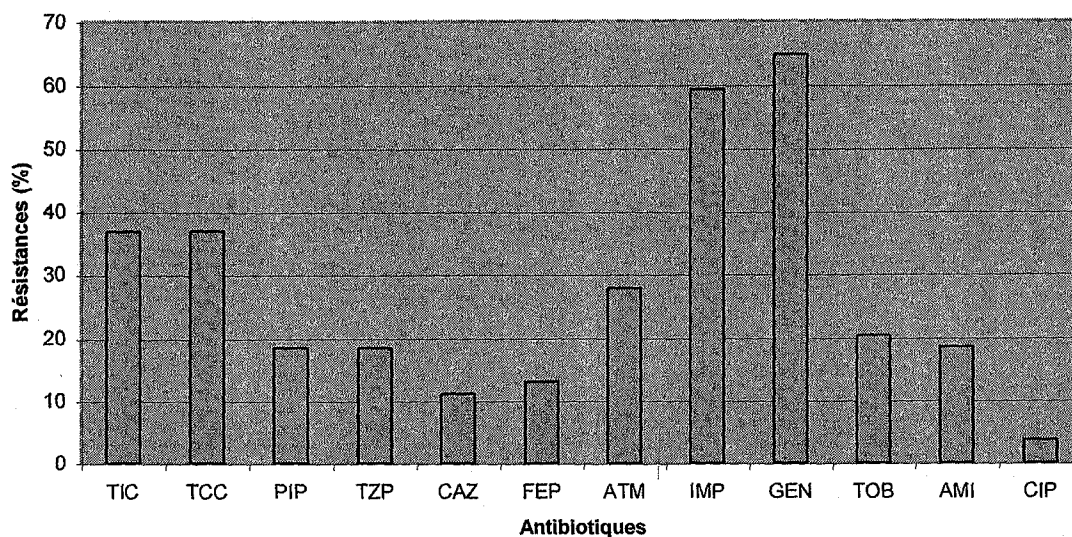


Figure 13d. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du service de traumatologie

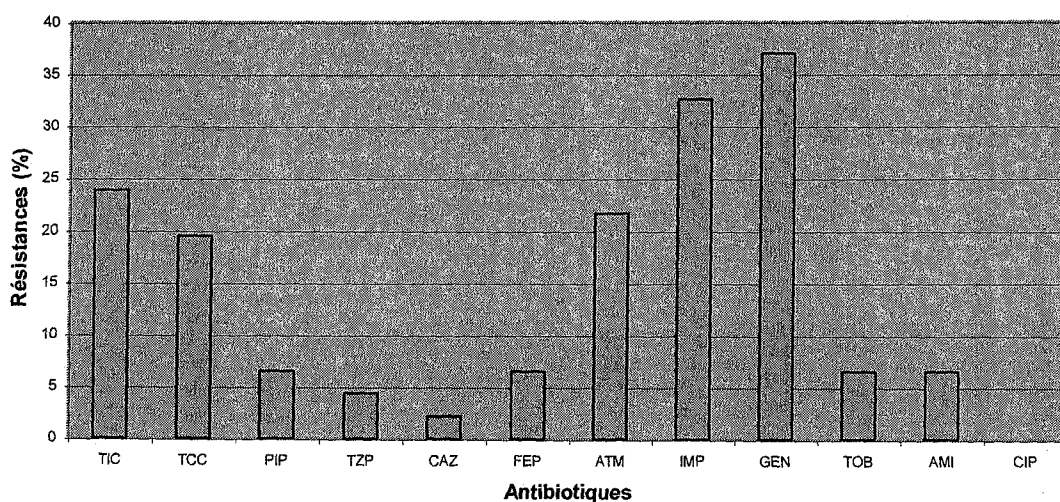
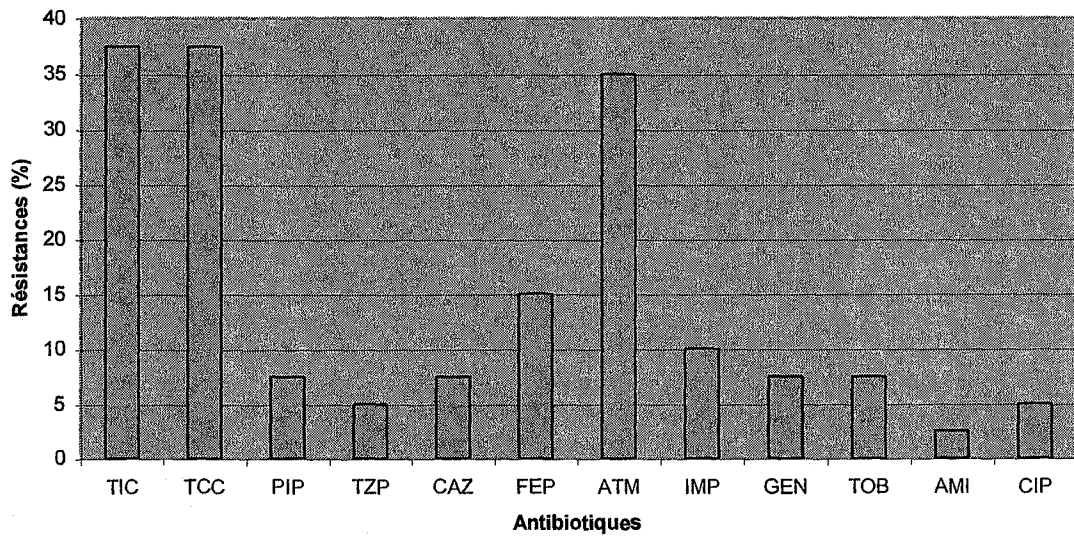


Figure 13e. Pourcentages de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du service de chirurgie



## ملخص

دراسة مقاومة ضد المضادات الحيوية لنوع *Pseudomonas aeruginosa* على مستوى مستشفى تلمسان. آليات المقاومة ضد البيبتالاكتامين.

مجموع 255 سلالة من نوع *Pseudomonas aeruginosa* تم عزلها على مستوى المستشفى الجامعي بتلمسان. نسب حساسية السلالات للمضادات الحيوية المحددة بطريقة التحليل في وسط صلب كانت: تيكروسيلين 52%، بيبيراسيلين 72%، سيفتازديم 79%، سفبييم 72%، أمبينام 60%، أميكاسين 77%، توبراميسين 76%، وسيبروفلوكساسين 95%، وهذا وفقا للمعايير المقترحة من قبل CA-SFM. تم ربط مقاومة البيبتالاكتامين بإنتاج أنزيم البيبتالاكتماز المتنقلة (16%)، بالإنتاج المفرط لأنزيم سيفالوسبوريناز AmpC (12%) و/أو بآليات غير أنزيمية مثل ضياع بروتين العبور OprD (40%) والإنتاج المفرط لجهاز صرف المضادات الحيوية من البكتيريا Mex AB-OprM (19%). المقاومة ذات المستوى العالي لتيكارسيلين كانت ناتجة عن إكتساب أنزيم البيبتالاكتماز OXA10 وحدها أو مشتركة مع TEM-110 الذان كانا سهل الانتقال بين سلالات *Pseudomonas aeruginosa*. أظهر التحليل الجيني انتشار كلون (clone) وبائي متعدد المقاومة ومنتج لهذين الأنزيمين، الذي إنتشر في مصلحة الإنعاش للجراحة.

كلمات مفاتيح: *Pseudomonas* - بتالاكتامين، مقاومة، تلمسان، وباء.

## Résumé

**Titre:** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du CHU de Tlemcen. Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines

Un total de 255 souches non répétitives de *Pseudomonas aeruginosa* ont été collectées à l'hôpital universitaire de Tlemcen (Algérie). Les taux de sensibilité des souches aux antibiotiques déterminés par la méthode de dilution en milieu gélosé ont été: ticarcilline (52%), pipéracilline (72%), ceftazidime (79%), céfépime (72%), imipénème (60%), amikacine (77%), tobramycine (76%) and ciprofloxacine (95%) conformément aux concentrations critiques définies par le CA-SFM. La résistance aux bêta-lactamines a été associée à la production de  $\beta$ -lactamases transférables (16%), la surproduction de céphalosporinase AmpC (12%) et/ou à des mécanismes non enzymatiques tels que la perte de la porine OprD (40%) et la surexpression du système d'efflux MexAB-OprM (19%). La résistance de haut niveau à la ticarcilline était due à l'acquisition de  $\beta$ -lactamase OXA-10 seule ou associée avec TEM-110, qui ont été facilement transférables entre des souche de *P. aeruginosa*. L'analyse génotypique a révélé une dissémination dans le service de réanimation chirurgical de clone épidémique multirésistant produisant ces 2 enzymes.

**Mots clés:** *Pseudomonas aeruginosa*;  $\beta$ -lactams; resistance; Tlemcen; Epidémie

## Abstract

**Title:** Antibiotic resistance's study of *Pseudomonas aeruginosa* in Tlemcen's hospital. Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance

A total of 255 consecutive strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected in the University-affiliated Hospital of Tlemcen (Algeria). The percentages of susceptible isolates measured by the agar dilution method were: ticarcillin (52%), piperacillin (72%), ceftazidime (79%), cefepime (72%), aztreonam (59%), imipenem (60%), amikacin (77%), tobramycin (76%) and ciprofloxacin (95%). Resistance to  $\beta$ -lactams was linked to the production of transferable  $\beta$ -lactamases (16%), overproduction of cephalosporinase (19%) and to non-enzymatic mechanisms such as OprD loss (40%) or MexAB-OprM overproduction (19%). High level resistance to ticarcillin was due to the expression of  $\beta$ -lactamase OXA-10, associated or not with TEM-110, that were easily transferable between *P. aeruginosa* strains. Genotypic analysis reveals the spread of a multi-drug resistant epidemic clone in the surgical ICU expressing these two enzymes.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*;  $\beta$ -lactamines; resistance; Tlemcen; Outbreak