



Royaume du Maroc المملكة المغربية

كلية الطب والصيدلة  
+05210111 | +01511111 | +00000000  
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2017

Thèse N° 272/17

# LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE : MÉCANISMES ET MÉTHODES DE DETECTION AU LABORATOIRE

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 27/12/2017

PAR

Mlle. HNICHT Hajar

Née le 22 Février 1992 à Beni mellal

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

Antibiotique - Résistance bactérienne - Mécanismes - Méthodes de détection - Antibiogramme

JURY

M. LOUZI LHOUSSAIN.....  
Professeur de Microbiologie

PRESIDENT ET RAPPORTEUR

M. ERRAMI MOHAMED.....  
Professeur de Parasitologie - Mycologie

Mme. EL BOUKHRISSI FATIMA .....  
Professeur agrégé de biochimie

JUGES

# SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| <i>I. INTRODUCTION</i> .....  | 9  |
| <i>II. RETROSPECTIVE</i> .....  | 12 |
| A- LES ANTIBIOTIQUES.....   | 12 |
| A.1.-Définition .....   | 12 |
| A.2.-Historique .....   | 12 |
| A.3.-Chronologie .....  | 14 |
| A.4.-Classification des antibiotiques.....  | 16 |
| A.5.-Structure, classification et mode d'action des antibiotiques.....                          | 18 |
| B- LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....   | 22 |
| B.1.-Historique .....   | 22 |
| B.2.-Définitions .....  | 24 |
| B.2.1.-Résistance naturelle ou intrinsèque .....  | 25 |
| B.2.2.-Résistance acquise .....   | 25 |
| B.3.-Déterminisme de l'antibiorésistance.....   | 26 |
| B.3.1.-Le support génétique de la résistance .....  | 26 |
| B.3.1.a. La résistance chromosomique .....  | 26 |
| B.3.1.b. La résistance extra chromosomique : Les plasmides .....                                | 27 |
| B.3.2.-Le support biochimique de la résistance.....   | 29 |
| B.3.2.a. Inactivation enzymatique de l'antibiotique .....                                       | 29 |
| B3.2.b. Altération de la cible bactérienne .....  | 32 |
| B.4.-Récapitulatif des mécanismes biochimiques de résistance aux principaux antibiotiques ..... | 37 |
| B.5. -Mécanismes récents et mécanismes non conventionnels de résistance aux antibiotiques ..... | 38 |
| B.5.1. La résistance à la colistine .....   | 38 |
| B.5.2. La résistance coopérative .....  | 39 |
| B.5.3. Le résistome.....  | 40 |
| C. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....                                       | 42 |

|  |     |
|--|-----|
| III. -MOYENS DE DETECTION DE LA RESISTANCE BACTERIENNE.....  | 50  |
| A. METHODES PHENOTYPIQUES.....   | 50  |
| A.1.-L'antibiogramme .....   | 50  |
| A.1.1. -Introduction.....  | 50  |
| A.1.2. -Bactériostase et bactéricidie.....   | 51  |
| A.1.2.a. -Bactériostase et Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....   | 51  |
| A.1.2.b. -Bactéricidie et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) .....  | 57  |
| A.1.3. -L'antibiogramme standard .....   | 59  |
| A.1.3.a. -Conditions techniques .....  | 61  |
| A.1.3.b. -Recherches complémentaires .....   | 69  |
| A.1.3.c.. -Lecture interprétative .....  | 94  |
| A.1.3.d. -Compte rendu ou rapport d'analyse .....  | 96  |
| A.1.3.e. -Avenir de l'antibiogramme .....  | 96  |
| IV- DETECTION DE LA RESISTANCE BACTERIENNE PAR METHODES GENOTYPIQUES ...   | 98  |
| A. -introduction.....  | 98  |
| B. Amplification génique par polymérase chain réaction : PCR .....   | 98  |
| Exemple : Détection génotypique des résistances chez <i>Staphylococcus aureus</i> :...                                 | 99  |
| C. Hybridation sur puces:.....   | 103 |
| D. séquençage partiel ou total des gènes: .....  | 103 |
| E. La confrontation génotypique et phénotypique : une adaptation nécessaire à<br>l'interprétation des résultats :..... | 106 |
| V. LIMITES ET PERSPECTIVES .....   | 108 |
| CONCLUSION.....  | 111 |
| REFERENCES .....   | 114 |
| RESUME.....  | 118 |
| ANNEXES .....  | 140 |

## LISTE DES ABREVIATIONS :

|               |   |
|---------------|---|
| ADN           | : acide désoxyribonucléique   |
| AMP           | : ampicilline   |
| ARN           | : acide ribonucléique   |
| ATB           | : antibiotique.   |
| BLA           | : beta lactamines   |
| BLSE          | : Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu                              |
| BMR           | : bactéries multirésistantes  |
| C3G           | : céphalosporine de troisième génération.                               |
| Carba NP test | : Carba Nordmann-Poirel test  |
| CA-SFM        | : Comité de l'Antibiogramme-Société Française de Microbiologie.         |
| CAZ           | : ceftazidime   |
| CMB           | : concentration minimale bactéricide.                                   |
| CMI           | : concentration minimale inhibitrice.                                   |
| CNR           | : Centre National de Référence.   |
| D-Ala-D-Ala   | : D-Alanine-D-Alanine   |
| DDST          | : double-disk synergy tests   |
| EARS Net      | : Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens   |
| EARSS         | : Système européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens. |
| EB-BLSE       | : Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre étendu  |
| ECDC          | : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies.            |
| EPC           | : entérobactéries produisant les carbapénémases                         |
| ESI           | : l'ionisation par pulvérisation d'électrons.                           |

|           |  |
|-----------|--|
| I         | : souche intermédiaire.  |
| KKPC      | : K. pneumoniae carbapénémase                                  |
| MALDI-TOF | : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight |
| MH        | : Mueller-Hinton   |
| MSBL      | : spectrométrie de masse $\beta$ -lactamase.                   |
| NDM-1     | : New Dehli metallo-beta-lactamase 1.                          |
| OMS       | : organisation mondiale de la santé.                           |
| ORL       | : oto-rhino-laryngologie.                                      |
| PBP       | : <i>Penicillins binding proteins</i>                          |
| PCR       | : Polymerase Chain Reaction.                                   |
| R         | : souche résistante.   |
| RBAB      | : résistance bactérienne aux antibiotiques.                    |
| RFLP      | : restriction fragment length polymorphism.                    |
| S         | : souche sensible.   |
| SARM      | : <i>Staphylococcus Aureus Résistant à la Méthicilline</i>     |
| SFC       | : Sepsis Flow Chip.  |
| SHV       | : sulfhydryl   |
| SMAMM     | : la Société Marocaine de Microbiologie Médicale.              |
| SSCP      | : single strand conformational polymorphism.                   |
| TDS       | : test de double synergie.                                     |
| TEM       | : Temoneira.   |
| UE        | : union européenne.  |
| VIM       | : Verona IMipénémase   |

## LISTE DES FIGURES :

- Figure 1 : SIR Alexander Fleming (prix Nobel de médecine 1945)
- Figure 2 : classification des antibiotiques selon leur mécanisme d'action
- Figure 3 : Structure des bêtalactamines.
- Figure 4 : schéma du rôle physiologique des PBP.
- Figure 5 : Structure de la fosfomycine
- Figure 6 : transfert plasmidique par conjugaison
- Figure 7 : Représentation schématique du système d'efflux
- Figure 8 : Prévalence croissante de la multirésistance en Europe de 2002 à 2009 chez *Escherichia coli*
- Figure 9 : Prévalence de MRSA (SARM) dans les infections invasives en Europe en 2009
- Figure 10 : Taux de BMR en fonction des espèces les plus fréquemment isolées au CHU Hassan II de Fès.
- Figure 11 : évolution de la fréquence d'isolement des EBLSE à l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech de 2008 à 2012
- Figure 12 : Courbe représentant CMI et CMB
- Figure13 : Concordance CMI et diamètres d'inhibition
- Figure 14 : catégorisation de spectre d'activité d'un antibiotique
- Figure 15 : détection de b lactamase par le test céfinase
- Figure16 : Le principe (a) et l'interprétation (b) du test de Carba NP récemment mis au point pour l'identification rapide des producteurs de carbapénémases chez Enterobacteriaceae et Pseudomonas spp.
- Figure 17 : Test de détection de BLSE par synergie C3G ou aztréonam et inhibiteur de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam)

Figure 18 : Bandelette E-Test dans la détection des BLSE

Figure 19 : Gélose chromogène ChromID BLSE de BioMérieux™.

Figure 20 : Exacerbation des diamètres d'inhibition des disques C3G (CAZ et CTX) en présence de cloxacilline (CLA) chez *E coli* BLSE+ et AmpC haut niveau+.

Figure 21 : Bandelettes du Cica bêta Test

Figure22 : résistance hétérogène à la méticilline

Figure 23 : Performances des DDST utilisant des disques d'IPM ou de CAZ et des disques d'EDTA (1.900 µg) ou d'AMP.

Figure24 : flux de travail au cours de MALDI-TOF.

Figure 25 : procédure de détection des métabolites de beta lactamase par la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Figure 26 : Principe du test Carba NP

Figure 27 : Différentes étapes et cycles de la technique PCR

Figure 28 : Souche productrice de *A. baumannii* carbapenemase multi-résistante aux médicaments analysée par dosage SFC.

## LISTE DES TABLEAUX :

Tableau1 : Récapitulatif des mécanismes biochimiques de résistance aux principaux antibiotiques.

Tableau2 : l'état de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries objet de la surveillance en 2017.

Tableau 3 : milieux requis pour antibiogramme de diffusion sur gélose.

Tableau 4 : Critères de catégorisation de la sensibilité de *Staphylococcus spp* selon les valeurs critiques des CMI et des diamètres de zones d'inhibition de l'EUCAST 2017.

Tableau5 : souches de référence recommandées pour le contrôle qualité de l'antibiogramme.

Tableau 6 : les principaux déterminants de la résistance génétique impliqués dans la résistance à la méthicilline et à la vancomycine chez les pathogènes à Gram positif et les déterminants liés aux mécanismes de résistance des BLSE et la production de carbapénémases chez les bactéries Gram négatif.

Tableau 7: les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

Tableau8 : les antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques

Tableau9 : les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

## I-Introduction

Les antibiotiques sont considérés comme la révolution médicale de la deuxième moitié du 20<sup>ième</sup> siècle car ils ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux infections bactérienne apportant ainsi un immense bénéfice à l'humanité. Le début de l'ère moderne des antibiotiques a été intimement associé à deux sommités : Sir Alexander Fleming et Paul Ehrlich [1].

Malheureusement, les bactéries ont pu développer des moyens de résister à ces traitements. La gravité réside dans le risque de placer les médecins dans des situations d'impasse thérapeutique et mettre en jeu le pronostic vital du patient. Ce phénomène a été déjà prévu en 1945 par Alexander Fleming, pendant la conférence qu'il donna lors de la cérémonie de remise du Prix Nobel, où il mettait en garde la communauté scientifique contre le danger encouru en cas d'usage inapproprié des pénicillines ; tel qu'un sous-dosage ou une durée trop courte ; et contre les conséquences d'un tel acte *in vitro* et *in vivo* [1] [2] [3]. Ainsi, depuis l'introduction des sulfamides en 1937, le développement de mécanismes spécifiques de résistance a réduit leur utilisation thérapeutique. Cependant, la résistance aux sulfamides a été signalée dans les années 1930, ce qui révèle le même mécanisme de résistance qui fonctionne encore aujourd'hui [4]. Six ans après la production des aminoglycosides, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à ces molécules sont été développées [5].

Introduite en 1961, la méthicilline a été la première pénicilline semi-synthétique résistante à la pénicillinase ciblant les souches de *Staphylococcus aureus* productrices de pénicillinase. Cependant, une résistance à la méthicilline a été signalée peu de temps après son initiation [6] [7].

L'impact économique de la résistance bactérienne aux antibiotiques (RBAB) est considérable. Rien que dans l'Union européenne (UE), on estime qu'elle est responsable de plus de 25000 décès par an et entraîne des coûts de santé et une perte de productivité de plus de 1,5 milliard d'euros par an. En tant que défi mondial, économique et sociétal, s'attaquer à l'émergence de la résistance aux antimicrobiens nécessite l'adoption d'une approche multisectorielle dans le cadre d'«Une seule santé» [8]. Aux États-Unis, le CDC estime que les bactéries résistantes aux antibiotiques causent 2 millions de maladies et environ 23 000 décès chaque année [9].

Ainsi, l'on peut dire aujourd'hui que la diminution de l'efficacité des antibiotiques représente l'une des plus grandes menaces pour la santé humaine. Les décès annuels dus aux infections résistantes aux antibiotiques passeraient de 700 000 à 10 millions d'ici 2050, pour un coût cumulé de 100 000 milliards de dollars américains. [10] [11]

Au terme de six décennies d'utilisation des antibiotiques (antimicrobiens en général), la majorité des bactéries pathogènes pour l'humain et/ou pour l'animal a atteint des niveaux alarmants de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques. De telles infections entraînent souvent une augmentation du nombre d'hospitalisations, une augmentation des échecs thérapeutiques et la persistance de pathogènes pharmacorésistants. Des organismes tels que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* multirésistant et ultrarésistant, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacteriaceae* résistant au carbapénème et des bactéries produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, comme *Escherichia coli*, sont particulièrement préoccupants. [12]

Le présent travail a pour but de décrire les résistances bactériennes d'intérêt médical et actuelles et faire l'inventaire des méthodes de leur détection au laboratoire, ainsi que les progrès récents importants en la matière. Un aperçu sur les antibiotiques, leurs modes d'actions et les mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques sera rapporté.

## II-Rétrospective

### A- Les antibiotiques :

#### A-1-définition :

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules humaines dans notre propos). Ils permettent aux défenses naturelles du corps telles que le système immunitaire, de les éliminer. Ils agissent souvent en inhibant la synthèse d'une cellule bactérienne, la synthèse de protéines, l'ADN, l'ARN, par un agent désorganisant la membrane, ou d'autres actions spécifiques [13]. Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries. Au départ de molécules naturelles, cependant, des modifications chimiques sont souvent apportées (semi-synthèse) pour améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels. Aujourd'hui, la plupart des antibiotiques en usage clinique sont donc obtenus par semi-synthèse [14] [15].

#### A-2-historique :

Tout semble avoir commencé en 1889 où l'Allemand Rudolf Emmerich fut le premier à effectuer des essais cliniques sur une substance antibiotique, la pyocyanase [16]. Découverte par hasard un an auparavant, cette substance avait la capacité de détruire de nombreuses bactéries pathogènes, dont celles de la fièvre typhoïde, du charbon, de la diphtérie, de la peste, etc. Mais l'intérêt soulevé par cette découverte retomba rapidement, le médicament étant instable et toxique. Il fut cantonné à des utilisations externes sous forme de pommade pour les dermatoses [15]. Quelques années plus tard, Paul Ehrlich obtint de bons résultats sur la syphilis avec un colorant associé à de l'arsenic, le salvarsan. Mais la toxicité de la substance et ses effets secondaires importants relativisèrent cette efficacité [17]. Le milieu

médical fourmillait alors de découvertes ponctuelles, d'essais cliniques, de pistes explorées puis abandonnées. La chimiothérapie semblait devoir émerger comme une révolution dans l'art de traiter les maladies, mais il restait encore aux médecins à trouver le médicament «miracle», à la fois efficace et sans effets négatifs, car l'enthousiasme du public risquait de disparaître.

En 1887, le Français Ernest Duchesne fut le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des moisissures du genre *Penicillium* et à envisager des possibilités thérapeutiques. Mais son travail, encore trop précurseur, n'eut pas de suite [18] En 1928, à l'hôpital Sainte-Marie de Londres, le docteur Alexander Fleming redécouvrit ce phénomène. Alors qu'il effectuait des recherches sur les staphylocoques, il remarqua dans l'une de ses boîtes de Pétri, que les colonies de staphylocoques proches de la moisissure *Penicillium* étaient mortes. Il fut le premier à publier un article sur les effets antibactériens de la pénicilline [19]. (Figure 1)



[Figure 1 : SIR Alexander Fleming \(prix Nobel de médecine 1945\)](https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming)

[\[https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming\]](https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming)

Quelques années plus tard, Howard Florey, Ernst Chain et Norman Heatley étendirent les travaux de Fleming ; Ils réussirent à faire produire et à purifier la pénicilline, prouvant ainsi son intérêt en tant que médicament [20]. Alors que leurs recherches commençaient à être couronnées de succès, la Seconde Guerre mondiale fut déclarée. Le projet fut déplacé aux États-Unis pour le préserver des bombardements allemands, et les travaux s'orientèrent vers la fabrication en grandes quantités de la moisissure produisant la pénicilline. L'objectif était de pouvoir fournir un médicament pouvant traiter les nombreux blessés dus à la guerre. Le monde entier parla alors de la pénicilline et de ses effets miraculeux. Dans l'inconscient collectif, les antibiotiques commencèrent à devenir le remède aux maladies infectieuses. La fin de la Seconde Guerre mondiale vit l'apparition d'un autre antibiotique célèbre, la streptomycine. Produite par un micro-organisme vivant dans le sol, *Streptomyces griseus*, cette substance fut découverte par Waksman en 1943. Elle se révéla efficace contre les bactéries de certaines infections courantes, de la méningite et, surtout, de la tuberculose. La streptomycine fut le premier véritable médicament capable de lutter efficacement contre cette maladie chronique [15] [21]

### A-3-Chronologie : [22]

1903 : Découverte du Trypan Röd (premier antibiotique anti-parasitaire) par Paul Ehrlich (1854-1915).

1909 : Découverte du Salvarsan (606), puissant anti-syphilitique par Paul Ehrlich.

1921 : Synthèse du Stovarsol (anti-microbien peu toxique dérivé de l'arsenic) par Ernest Fourneau (1872-1949).

1928 : Découverte de l'action antibiotique du *Penicillum* par Alexander Fleming.

1935 : Gerhard Domagk (1895-1964) synthétise le Prontosil anti-microbien général. Ensuite, Jacques Tréfouel (1897-1977) et Constantin Levaditti (1874-1953) démontrent l'activité antibactérienne des sulfamides dérivés du Prontosil.

1939 : Ernst Chain et Howard Florey obtiennent la pénicilline pure. René Dubos (1901-1982) et Rollin Hotchkiss isolent, à l'Institut Rockefeller de New York, la thyrotricine (ou gramicidine).

1940 : Isolement de l'actinomycine par Selman A. Waksman (1888-1973).

1944 : Découverte, par Waksman, de la streptomycine, antibiotique actif contre les bactéries Gram négatives et, surtout, contre le bacille de Koch (agent de la tuberculose).

1945 : Fleming, Florey et Chain reçoivent conjointement le prix Nobel de physiologie ou médecine pour la découverte, l'isolement et l'emploi thérapeutique de la pénicilline.

1946 : Débuts de la préparation industrielle et de la commercialisation des antibiotiques.

1949 : Découverte des tétracyclines qui bloquent les synthèses protéiques dans les bactéries.

1965 : Développement des antibiotiques semi-synthétiques.

2000 : Synthèse totale du premier antibiotique de nouvelle génération, le Linézolide.

#### A-4-classification des antibiotiques

Il existe plusieurs modalités de classification des antibiotiques d'utilité variable :

- ∅ La structure chimique de base : bêtalactamines, aminoglycosides, quinolones, cyclines, ...
- ∅ La cible au niveau des bactéries : ribosomes, paroi, ...
- ∅ Le mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique, inhibition de la synthèse du peptidoglycane, ...
- ∅ Le spectre d'activité : groupes bactériens ou espèces sensibles.

*(Figure 2)*

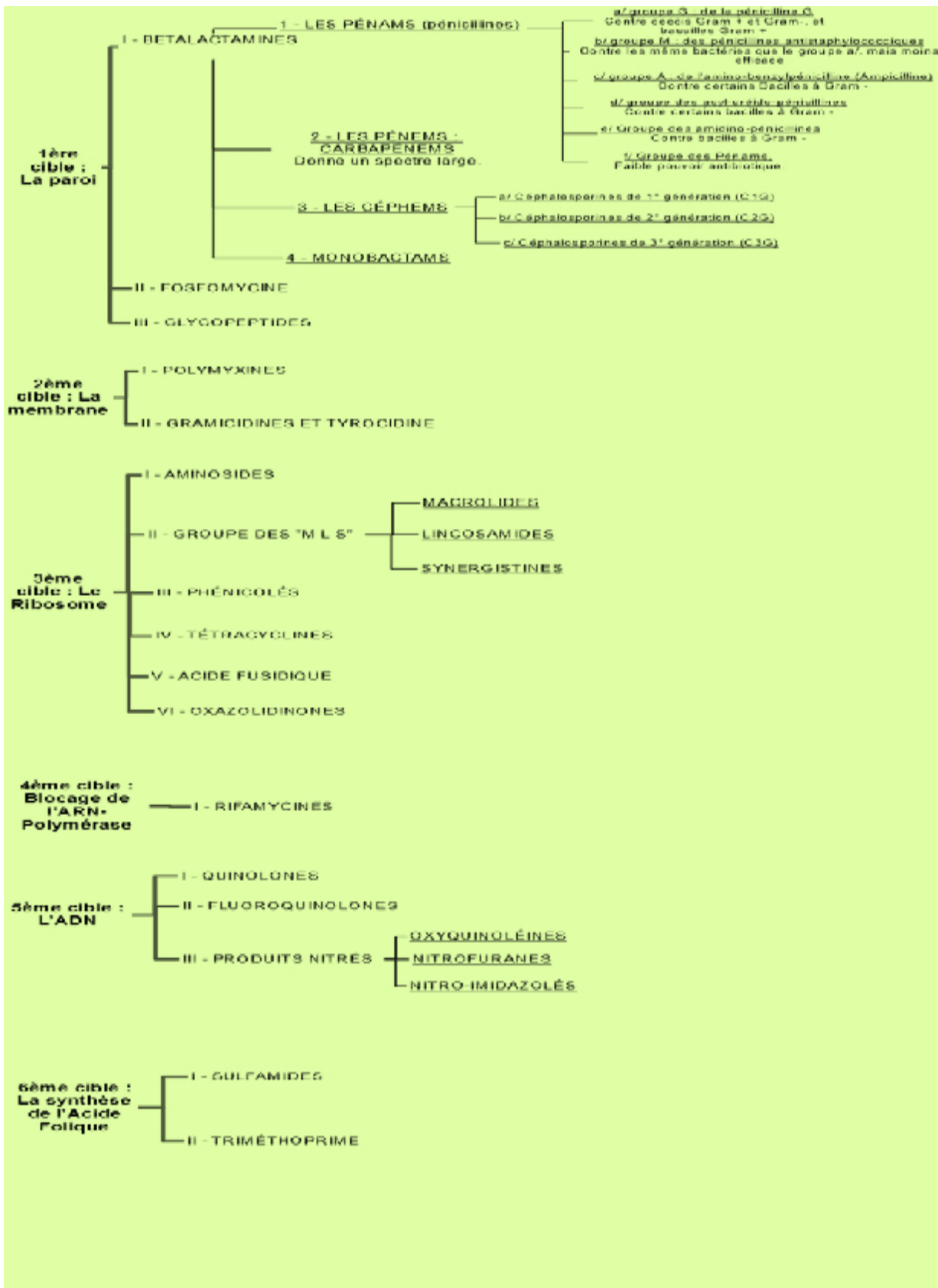


Figure 2 : classification des antibiotiques selon leur mécanisme d'action

[<http://www.sites.google.com/site/tpebacterieantibiotique/bacterie>

<http://img15.hostingpics.net/pics/302244antibiotique.jpg>

## A-5-Structure et mode d'action des antibiotiques : [23] [24] [25]

Exemple -les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne : (voir annexe 1)

### Exemple 1 -les bêtalactamines : BLA

- Structure chimique :

La structure des BLA est construite autour d'un cycle  $\beta$ -lactame, indispensable à leur activité. On distingue plusieurs familles de produits en fonction de la nature du cycle qui lui est accolé :

- ✓ pénème (cycle à 5 sommets dont un soufré): toutes les pénicillines
- ✓ clavame (cycle à 5 sommets dont un oxygéné): inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases
- ✓ carbapénème (cycle insaturé à 5 sommets carbonés):imipénème et produits apparentés
- ✓ céphème (cycle insaturé à 6 sommets dont un soufré): céphalosporines
- ✓ oxacéphème (cycle insaturé à 6 sommets dont un oxygéné):latamoxef.

En outre, on associe aux  $\beta$ -lactamines la famille des monobactames constituées par un cycle azétidine (amine cyclique à 4 pièces), substituée par une fonction  $SO_3^-$  qui mime la fonction carboxylique libre des autres molécules. (*Figure 3*)

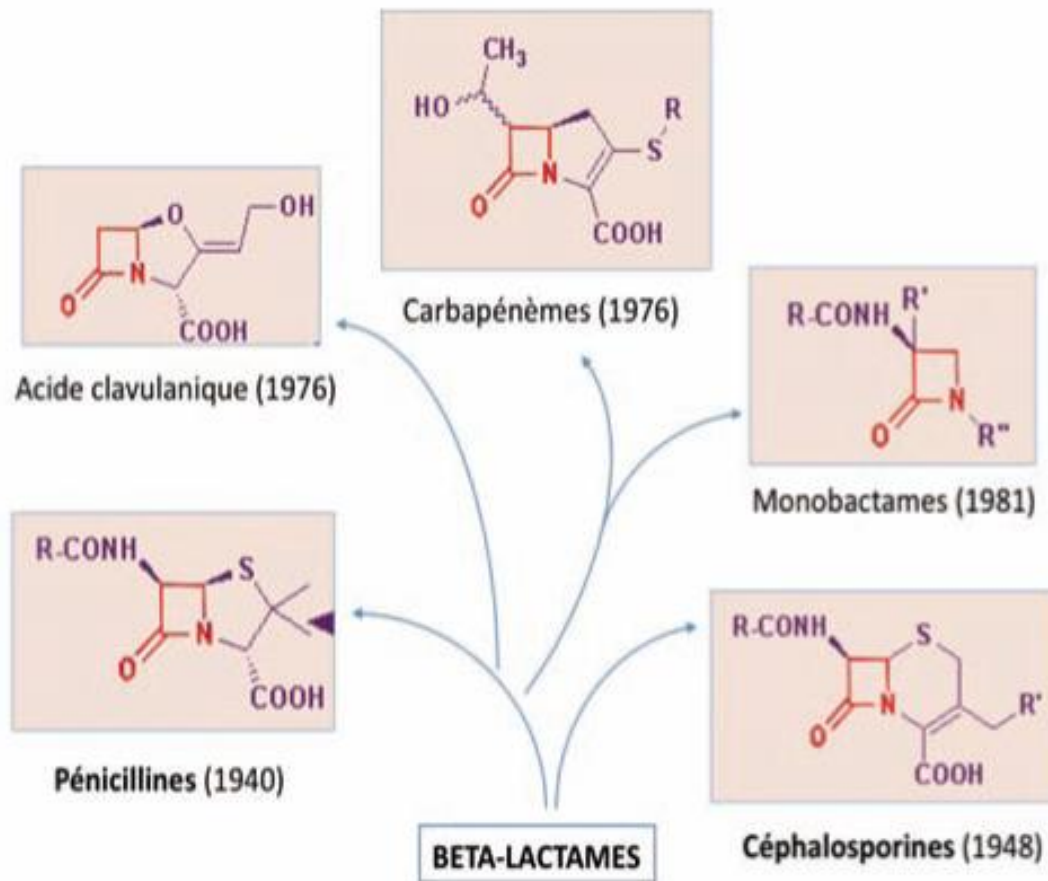


Figure 3 : Structure des bétalactamines.

[ source :Comte D, Petitpierre S, Bart PA, Spertini F. Allergie aux  $\beta$ -lactamines. Rev Med Suisse 2012; (8) : 836-842.]

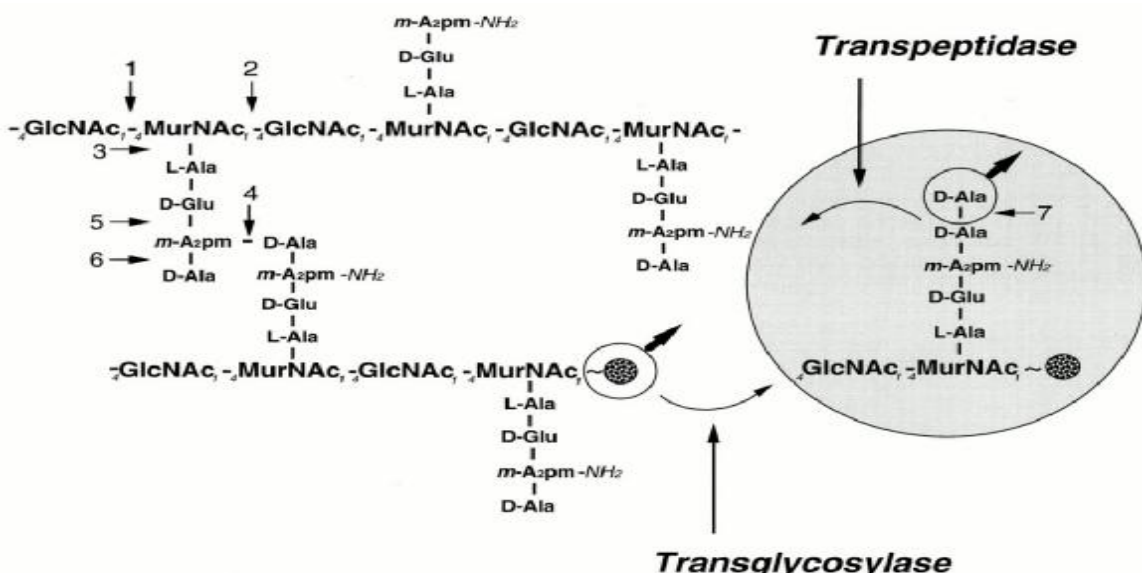
- Mécanismes d'action :
- ✚ Pénétration dans la bactérie :

L'accès des BLA à leur cible, le peptidoglycane, est direct quand il est question de bactéries Gram (+). En revanche, les  $\beta$ -lactamines doivent emprunter les passages ménagés par les porines au niveau de la membrane externe des bactéries Gram (-) pour rejoindre l'espace péri plasmique où elles exerceront leur activité.

🚩 Activité antibactérienne :

Les antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne. En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Ala-D-Ala du pont peptidique du peptidoglycane (Distance adéquate entre le carboxylate et le cycle amide), les  $\beta$ -lactamines se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase, enzyme clé dans la synthèse du peptidoglycane qui assure la forme et l'intégrité de la cellule bactérienne. En présence d'antibiotique, cette enzyme, qui agit comme une acyl-transférase à sérine active, exerce son action hydrolytique sur la molécule d'antibiotique, conduisant à la formation d'un complexe enzyme-produit qui ne se dissocie pas car l'enzyme est lié de façon covalente au produit. [26] [27]

Cette transpeptidase possède également une propriété de transglycosylation, activité complémentaire dans la synthèse de la paroi. Ces enzymes portent les noms de Protéines liant les pénicillines (PLP) ou PBP (*Penicillins binding proteins*). Figure 4.



[Figure 4 : schéma du rôle physiologique des PBP.](#)

[Joachim Volker Höltje]

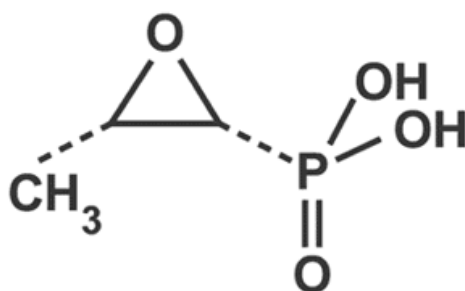
L'ensemble des perturbations de la formation de la paroi bactérienne par l'inhibition des PBP explique l'arrêt de croissance de ces bactéries. L'effet bactéricide serait obtenu indirectement par activation d'enzymes lytiques, par sensibilité à l'hypotonie extracellulaire, ou par d'autres effets encore mal compris. Chez certaines espèces bactériennes à Gram (+) déficientes en système d'hydrolases, un phénomène de tolérance à l'antibiotique s'installe et conduit à la perte du pouvoir bactéricide, mais au maintien d'une activité statique.

[28] Ainsi, les BLA n'agissent que sur des bactéries en croissance active.

### Exemple 2 : la fosfomycine

La fosfomycine (encore appelée fosfonomycine, phosphomycine ou MK-955) est un antibiotique bactéricide produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae*. La fosfomycine appartient à la famille des acides phosphoniques (Figure 6). Elle agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En effet, la fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase (ou pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine-transférase), ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique (réaction ci-dessous), l'un des constituants essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne.

UDP-N-acétylglucosamine + Phosphoénolpyruvate → Phosphate + Acide UDP-N-acétyl-muramique



[Figure 5 : Structure de la fosfomycine](http://www.123bio.net/cours/antibio/fosfomycine.html)

[\[http://www.123bio.net/cours/antibio/fosfomycine.html\]](http://www.123bio.net/cours/antibio/fosfomycine.html)

Le mode d'action de la fosfomycine nécessite sa pénétration intracytoplasmique qui se fait par un transport actif (système de transport de glycérophosphate et des hexoses monophosphates). L'absence ou l'inactivation (par mutation chromosomique) de ce système de transport actif provoque une résistance à la fosfomycine [29].

Les antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques : [30] [31] (*voir annexe 2*)

Les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique : [30] (*voir annexe 3*)

## B-LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES :

### B-1-historique : [32]

Travaillant sur la pénicilline, c'est dès 1940 qu'*Abraham* et *Chain* observent que des extraits de différentes bactéries sont capables de détruire la molécule. A cette époque la pénicilline n'avait pas encore été utilisée en thérapeutique [3]. Une autre observation importante est faite par *Mary Barber* en 1949 où elle a remarqué que des staphylocoques résistants à la pénicilline perdent spontanément et à fréquence relativement élevée l'aptitude à produire une pénicillinase alors que la réversion de ces souches, restaurant la production de l'enzyme, n'a pas lieu [33]. Les théories génétiques de l'époque, basées sur le schéma classique mutation sélection n'étaient pas satisfaisantes pour interpréter un tel phénomène. Ultérieurement, l'utilisation thérapeutique croissante d'antibiotiques appartenant à des familles de plus en plus nombreuses conduisit, en particulier chez les entérobactéries, à l'émergence de souches bactériennes résistantes à plusieurs antibiotiques. Ce fut le cas au Japon, au début des années 50, où suite à l'introduction de la streptomycine, de la tétracycline et du chloramphénicol et à leur utilisation massive, des souches résistantes à ces antibiotiques apparaissent [34]. En

1955, *Ochiai* et *Akiba* observent, lors d'une épidémie de dysenterie bacillaire, que les *Shigella* responsables, initialement sensibles, sont devenues simultanément résistantes à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et aux sulfamides. La survenue chez ces souches de mutations simultanées est d'une probabilité tellement infime qu'elles ne pouvaient expliquer le phénomène apparu. *Akiba* (1960) émet alors l'hypothèse que la résistance multiple a été transférée aux *Shigella* dans l'intestin des malades par simple contact avec des *Escherichia coli* présents multi résistants [35]. Le mélange des souches in vitro, suivi de l'acquisition de la résistance par *Shigella*, permit de confirmer l'hypothèse. L'existence de bactéries multirésistantes fut aussi découverte chez les bactéries à Gram positif, notamment les staphylocoques. C'est chez les staphylocoques que l'on remarque que le traitement des bactéries avec des agents courants comme l'acriflavine pouvait entraîner l'élimination de la résistance. L'ensemble de ces observations - multirésistance, transferts, cure - conduisit *Novick* (1963) à supposer que la résistance était associée à une structure extrachromosomique qu'il appela plasmide [36]

La troisième étape historiquement importante fut, en 1974, la découverte par *Hedges* et *Jacob* que des gènes de résistance situés sur des plasmides étaient transposables. Le premier transposon portant un gène de résistance codait pour la résistance à l'ampicilline (*TnI*) [37]. Depuis cette date, il est apparu que la plupart des gènes de résistance pouvaient se transposer (*Levy*, 1982) [38]. Ces transposons qui prévalent sont largement distribués sur des plasmides différents et des espèces bactériennes distinctes. Importants dans l'évolution des bactéries, ils ne sont pas sans incidence sur l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques.

## B-2-Définitions :

La résistance bactérienne est retenue lorsqu'un antibiotique perd sa capacité à inhiber efficacement la croissance bactérienne. Autrement dit, les bactéries continuent de se multiplier en présence de concentrations thérapeutiques d'antibiotiques [39]. A ce moment où les microbes deviennent moins sensibles ou résistants, il faut une concentration supérieure à la concentration normale du même médicament pour avoir un effet, condition pas toujours possible *in vivo*. La résistance aux antibiotiques peut se produire comme un processus de sélection naturelle où la nature permet à toutes les bactéries d'avoir un certain degré de résistance à faible niveau [40]

L'émergence de la résistance aux antimicrobiens a été observée peu de temps après l'introduction de tout antibiotique nouveau [41]

D'autres définitions sont également retenues pour qualifier la RBAB:

- Une bactérie est dite résistante quand la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre *in vivo* sans effet toxique sur le malade.
- une souche bactérienne est dite résistante quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture.

Ces deux dernières définitions doivent être complétées par deux autres : l'une clinique et l'autre génétique.

- La définition clinique associe la notion de succès et d'échec clinique. En première approximation, une bactérie résistante est une bactérie qui échappe au traitement, ce qui peut se manifester par un échec thérapeutique.

- La définition génétique correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie, détectés par des techniques biophysiques et/ou génétiques.

#### B-2-1-Résistance naturelle ou intrinsèque : [42]

C'est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes).

#### Exemple de résistances naturelles :

1/ *Klebsiella spp* produit naturellement des pénicillinases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne ; les PLP.

2/ les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies.

#### B-2-2-Résistance acquise : [42]

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce [43].

La résistance acquise a été observée dès le début de l'antibiothérapie mais sa fréquence était initialement faible. La généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis-à-vis des antibiotiques d'où l'intérêt et la nécessité de réaliser des antibiogrammes.

### B-3-déterminisme de l'antibiorésistance :

La résistance bactérienne aux antibiotiques possède des supports génétiques et des mécanismes biochimiques.

#### B-3-1- Le support génétique de la résistance : [43]

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique [44].

#### B-3-1-a-La résistance chromosomique : [45]

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard, d'une fréquence de l'ordre de  $10^{-5}$ . Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique ; mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). C'est un phénomène indépendant : l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations

simultanées est donc très faible (de l'ordre de  $10^{-10}$ ). Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible ; et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles). Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique par un phénomène de dilution.

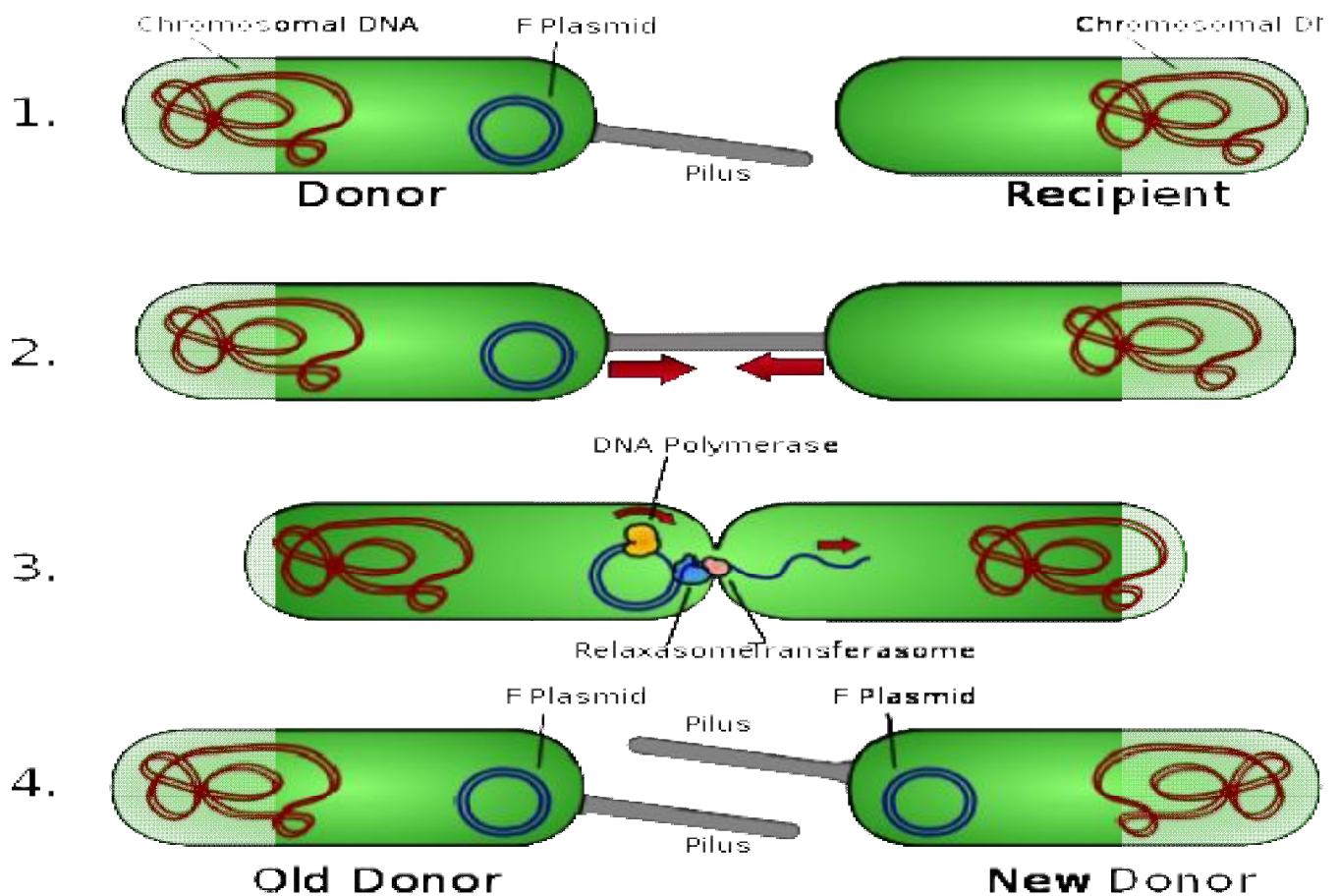
### B-3-1-b-La résistance extra chromosomique : les plasmides

Deux faits expliquent l'importance de la résistance plasmidique :

✚ la résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique.

✚ de nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal. Ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou épidémique". Les plasmides de résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments génétiques transposables. Les éléments génétiques transposables permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées en permettant l'implantation d'un gène là où celle d'un plasmide échoue. Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extrachromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries porteuses de tels

gènes. Il est important de noter que la résistance extra-chromosomique étant souvent une multirésistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multirésistantes qui ne sont pas contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique.



[Figure 6 : transfert plasmidique par conjugaison](#)

[[https://fr.wikipedia.org/wiki/Conjugaison\\_genetique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Conjugaison_genetique)]

### B-3-2-le support biochimique de la résistance : [25] [42]

Les mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques peuvent être classés en 4 groupes :

#### B-3-2-a-Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

##### ü Les betalactamases :

Ce mode de résistance implique l'inactivation de l'antibiotique (perte d'activité) par une enzyme bactérienne.

Les  $\beta$ -lactamases catalysent l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. Le résultat est une destruction du site actif de la molécule antibiotique [46] [47].

- Classe A: enzymes caractérisés par la présence d'une sérine dans leur site actif, elles dégradent préférentiellement les pénicillines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique.
- Classe B: métallo-enzymes qui ne sont actives qu'en présence de  $Zn^{2+}$ . elles sont donc inhibées par des agents chélateurs de cations bivalents. Ces enzymes ont généralement un large spectre d'activité, elles sont impliquées dans la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*.
- Classe C: enzymes présentant surtout une activité sur les céphalosporines. Ils ne sont pas inhibés par l'acide clavulanique. C'est la cloxacilline qui permet *in vitro* d'inhiber leur production par la bactérie, permettant ainsi de les caractériser.
- Classe D: ces enzymes agissent principalement sur les pénicillines. Ils sont variablement inhibés par l'acide clavulanique. Leur mise en évidence *in vitro* est difficile par les tests phénotypiques.

### 🚩 Cas particulier de BLSE :

#### Ø Définition des BLSE :

Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes produites par certaines bactéries les rendant résistantes à de nombreux antibiotiques incluant les C3G et aztréonam. Le gène codant est présent au niveau du chromosome de bactéries particulières et transféré à d'autres populations bactériennes par l'intermédiaire de plasmides. Nombreuses Entérobactéries productrices de BLSE (EB-BLSE) sont connues aujourd'hui, dont *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. Les premières infections à EB-BLSE sont rapportées chez *K. pneumoniae* en Allemagne en 1983 et ont diffusé à toute l'Europe ainsi qu'en Amérique. En Asie, les premières infections ont été notées en Chine en 1988 [48] [49] [50].

#### Ø Types de BLSE:

Le type de BLSE que l'on trouve généralement est Temoneira (TEM). Environ 90% des *E. coli*, qui sont résistants à l'ampicilline, sont survenus en raison de la production de TEM-1. Ce type a la capacité d'hydrolyser la pénicilline et de céphalosporine première génération. Bien qu'il se trouve habituellement dans *E. coli* et *K. pneumoniae*, la fréquence de la  $\beta$ -lactamase de type TEM augmente également chez d'autres bactéries à Gram négatif. Jusqu'à récemment, il y a 140 types TEM connus. Le second type est la variable sulfhydryle (SHV) dont 68% de son acide aminé est similaire au type TEM. Le plus souvent trouvé chez *K. pneumoniae* est SHV-1 qui provoque une résistance à la pénicilline, à la tigécycline et à la pipéracilline. Il y a 60 types SHV connus jusqu'ici en Europe, en Amérique et dans le monde entier. Le type TEM-1 et SHV-1 ont la capacité d'inactiver l'ampicilline, et certains d'entre eux peuvent subir d'autres mutations qui conduiront à une expansion de l'activité  $\beta$ -lactamase [51]

Il y a plus de 80 types de céphotaxime connus jusqu'à présent. L'enzyme CTX-M ne se limite pas à l'infection nosocomiale mais à la capacité de se propager dans la communauté (habituellement par *E. coli*) et ceci est devenu un problème de santé publique. Selon une enquête réalisée en 2000, la prévalence de BLSE-E dans la communauté des pays européens a augmenté. Une étude menée par Ben-Ami et al [52]. en Israël a révélé que 14% des infections à BLSE ont un début dans la communauté. Cette étude a également montré qu'il y avait un risque accru d'infection dans les maisons de soins infirmiers. De plus, Rodriguez-Bano et al [53] a comparé l'utilisation des antibiotiques  $\beta$ -lactamines et des inhibiteurs des  $\beta$ -lactamines (BLA) au carbapénème dans le traitement des infections causées par les BLSE-EC en 2011 auprès de 103 patients espagnols. 51% des cas sont survenus dans la communauté.

#### ü Les enzymes modifiant les aminoglycosides :

Elles se répartissent en 3 classes :

Les N-acétyltransférases (AAC : aminoside acétyl-transférase), les O-nucléotidases (ANT : aminoside nucléotidyl-transférase), les O-phosphorylases (APH : aminoside phospho-transférase). Plusieurs enzymes distinctes peuvent inactiver une même position sur la molécule d'aminoglycoside, et une même bactérie peut posséder les gènes codant pour plusieurs enzymes.

Ces gènes sont parfois localisés sur le chromosome (éventuellement, sur des transposons) mais sont le plus souvent portés par des plasmides transférables. On les trouve fréquemment chez *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries et les coques à Gram (+). Leur impact clinique est exacerbé par la co-transmission fréquente de  $\beta$ -lactamases [54].

ü La chloramphénicol-acétylase

Elle confère la résistance des bactéries Gram (+) et (-) au chloramphénicol. L'usage de cet antibiotique étant très limité en raison de sa toxicité hématologique. L'impact de ce type de résistance est faible. Ce gène est, en revanche, utilisé comme outil en biologie moléculaire car il peut être inséré dans un plasmide à transférer dans une cellule eucaryote et permet de vérifier le niveau d'expression des promoteurs en mesurant l'acétylation du chloramphénicol dans le milieu de culture [43].

ü L'érythromycine estérase

Elle inactive le cycle lactone de l'érythromycine. Ce mode de résistance plasmidique est toutefois assez rare et n'a été décrit que pour des *E. coli* ; bactérie n'entrant pas dans le spectre des macrolides [55].

ü Une fluoroquinolone acétylase

Elle active sur les molécules présentant un substituant pipérazine a été récemment décrite [56].

B-3-2-b-Altération de la cible bactérienne :

ü Altération de la cible ribosomiale :

Les antibiotiques qui agissent sur la synthèse protéique peuvent voir leur activité annihilée par une mutation de leur site de fixation sur le ribosome bactérien.

Au niveau de la sous-unité 50S des ribosomes, une méthylation confère la résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines chez *S. aureus*, *S. sanguis*, *B. fragilis*, ou *C. perfringens*. Elle peut être constitutive (MLSb-c) ou inducible (MLSb-i), plasmidique ou chromosomique. De même, une altération de la liaison des tétracyclines d'origine encore inconnue rend résistants les bactéries Gram (+), *Neisseria* et *Campylobacter* [57].

Au niveau de la sous-unité 30S, une mutation confère la résistance à la streptomycine [57].

### ü Altérations des précurseurs de la paroi :

Les glycopeptides doivent leur action antibiotique à leur liaison aux extrémités D-Ala-D-Ala des chaînes pentapeptidiques des précurseurs de peptidoglycane. Des souches d'entérocoques ont acquis un ensemble de gènes conduisant à la production d'une série d'enzymes permettant la synthèse de peptidoglycane au départ d'un précurseur caractérisé par une extrémité D-Ala-D-Lac à laquelle les glycopeptides ne se lient plus [58]. Suivant le phénotype de la souche, on distingue la résistance induite par l'exposition à la vancomycine ou à la téicoplanine (VanA) ou à la vancomycine seule (VanB et VanC). Le gène *VanA* confère la résistance à la vancomycine et à la téicoplanine alors que le gène *VanB* confère la résistance à la vancomycine mais en principe pas à la téicoplanine puisque celle-ci n'est pas inductrice. Le gène *VanC* ne confère la résistance qu'à la vancomycine [59].

### ü Altérations d'enzymes-cibles :

Les antibiotiques inhibiteurs d'enzyme sont rendus inactifs lorsqu'une mutation de l'enzyme-cible y empêche leur liaison.

- La résistance aux  $\beta$ -lactamines peut être due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PBP suite à une mutation de celles-ci, ou à une diminution de leur nombre. Ces deux mécanismes peuvent se rencontrer chez les Gram (+) alors que seule la réduction d'affinité est documentée chez les Gram (-). L'exemple le plus connu de ce type de résistance est constitué par les MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) appelés aussi SARM [60].

- La résistance aux sulfamides et au triméthoprime est le plus souvent due à la production de dihydroptérorate synthase (plasmidique) ou de dihydrofolate réductase (chromosomique ou plasmidique) modifiées et ne liant plus l'antibiotique [61].

- La résistance aux fluoroquinolones peut être due à la mutation de l'ADN gyrase, qui empêche la formation du complexe ternaire fluoroquinolone - gyrase - ADN. Ce mode de résistance est décrit pour *P. aeruginosa*, les entérobactéries, *E. coli* et les Gram (+) [62].

#### ü Altération de la concentration de l'antibiotique dans la bactérie :

##### ✚ Altération des membranes bactériennes :

La membrane externe des bactéries Gram (-) peut constituer une barrière à la pénétration des antibiotiques. En effet, le passage de petites molécules hydrophiles n'est possible que grâce à la présence des porines qui forment des canaux hydrophiles à travers cette membrane. En revanche, des molécules trop volumineuses ou insuffisamment hydrophiles ne pourront emprunter cette voie d'accès et ne pénétreront que modestement dans les bactéries.

Toute mutation affectant une porine va perturber la pénétration de l'antibiotique dont elle permet l'entrée. Il existe ainsi des défauts de pénétration des  $\beta$ -lactamines principalement, mais aussi des aminoglycosides, du chloramphénicol ou des quinolones [63] [54] [64].

La membrane interne porte elle aussi des transporteurs susceptibles de favoriser la pénétration des antibiotiques. Ainsi, les aminoglycosides polycationiques et donc très hydrophiles nécessitent l'intervention d'un transporteur anionique actif pour rejoindre leur cible intracellulaire. Un traitement au long cours par un aminoglycoside peut induire une résistance réversible par altération du système de transport [54].

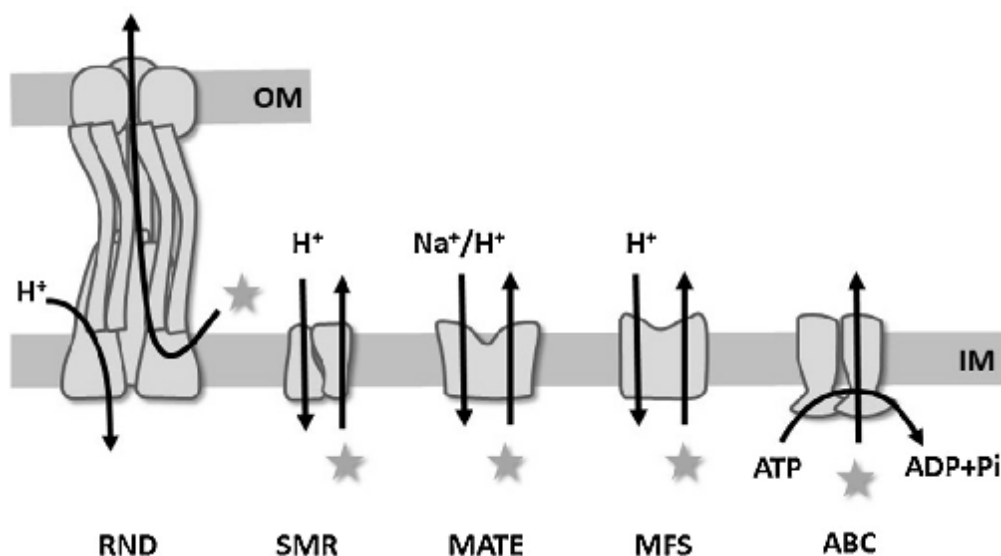
##### ✚ Efflux de l'antibiotique :

Une réduction de l'accumulation intrabactérienne suite à l'expression d'un transporteur actif qui expulse l'antibiotique hors de la cellule bactérienne, a été décrite pour la première fois vis-à-vis des tétracyclines. Aujourd'hui, il apparaît qu'il s'agit d'un mécanisme de résistance extrêmement répandu et capable de réduire

l'activité de la quasi-totalité des classes d'antibiotiques (par exemple, macrolides, fluoroquinolones, sulfamides, aminoglycosides...) [65].

Le système d'efflux est un système général de détoxification des cellules eucaryotes et les bactéries. Il est destiné à évacuer les substances « jugées toxiques » par la cellule : les cytostatiques anticancéreux, les antibiotiques, ... [66].

De façon inquiétante, on décrit à présent des pompes capables de reconnaître plusieurs classes d'antibiotiques et donc responsables d'une résistance croisée. Ces pompes sont particulièrement présentes chez les bactéries à Gram-négatif, comme *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, sont substrats de la seule pompe MexABOprM: Les  $\beta$ -lactames, l'acide fusidique, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, le chloramphénicol, la rifampicine, les fluoroquinolones et les sulfamidés. Par ailleurs, une bactérie peut aussi exprimer plusieurs pompes et donc résister de la même façon à davantage de classes d'antibiotiques, y compris la colistine chez les bactéries Gram (-) [67] (Figure 7).



[Figure 7 : Représentation schématique du système d'efflux](#)

[Source: SHERNANDO-AMADO ,et al. Drug Resistance Updates, 2016 (28) : 13–27]

ABC = ATP Binding Cassette; RND = Resistance Nodulation and cell Division; MFS = Major Facilitator Superfamily; MATE = Multi AnTimicrobial Extrusion; SMR = Small Multidrug Resistance; IM = Internal Membrane; OM = Outer Membrane.

### ü Multiplication ou protection de la cible

Une stratégie plus rare consiste dans une multiplication de la cible, de telle sorte que l'antibiotique est « noyé » et incapable de saturer celle-ci.

Un exemple est décrit chez *S. aureus*, où des souches présentent un niveau de résistance intermédiaire aux glycopeptides par production d'une paroi épaisse où abondent des résidus D-Ala-D-Ala (phénotype VISA [Vancomycin Intermédiate *S. aureus*] [68]).

Un autre mécanisme consiste dans la protection de la cible. C'est le cas pour la résistance aux tétracyclines, qui peut résulter d'une protection ribosomale. Celle-ci est assurée par la production de protéines cytoplasmiques qui lient les tétracyclines. De la même manière, on a décrit récemment une résistance aux fluoroquinolones médiée par la production de protéines dont la structure tertiaire mime celle de l'ADN, déplaçant les fluoroquinolones de leur liaison à l'acide nucléique [69].

**B-4-Récapitulatif des mécanismes biochimiques de résistance aux principaux antibiotiques :** (voir tableau suivant)

Tableau 1 : Récapitulatif des mécanismes biochimiques de résistance aux principaux antibiotiques :

| <u>mécanisme</u>                        | <u>Inactivation enzymatique</u>  | <u>Modification de la cible</u>   | <u>efflux</u>  | <u>impermeabilité</u>   |
|---|--|---|--|---|
| <u>Les <math>\beta</math>lactamines</u> | La production des $\beta$ -lactamases.   | Une altération des PBP peut réduire leur affinité pour les $\beta$ -lactames.   | Un efflux actif à l'aide de transporteurs peut conférer un niveau modéré de résistance à la plupart des $\beta$ -lactames. Il se rencontre surtout chez <i>P. aeruginosa</i> . | se rencontre chez les Gram (-) et confère une résistance aux $\beta$ -lactames trop hydrophiles pour diffuser à travers la membrane externe (céphalosporines ; pénicillines à large spectre). |
| <u>Les macrolides</u>                   | décrit uniquement chez <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , implique la production d'enzymes (érythromycine estérases) | plus préoccupant dans les souches de Staphylocoques et de Streptocoques.  | La résistance par efflux est le mécanisme le plus fréquent de résistance chez <i>Streptococcus pyogenes</i> , mais il est également présent chez <i>S. pneumoniae</i>          |   |
| <u>Les aminosides</u>                   | C'est le mécanisme de résistance le plus courant.  | Une diminution de l'affinité de l'aminoglycoside pour sa cible ribosomiale est liée à la production d'une méthylase. On les retrouve actuellement essentiellement chez les bacilles Gram(-) non fermentants et les entérobactéries. |  | Une impermeabilité de la bactérie est responsable d'une résistance croisée à tous les aminoglycosides. Elle se rencontre chez certaines souches de <i>Staphylococcus</i>                      |
| <u>Les quinolones</u>                   |  | Ce mécanisme dépend de la production d'une protéine qui lie les fluoroquinolones et est capable de les déplacer de leur liaison à l'ADN gyrase ou à la topoisomérase IV. Ce mécanisme se répend chez les Gram(-).                   | L'acquisition ou la surexpression d'une pompe à efflux fonctionnant par échange contre les protons réduit la concentration des fluoroquinolones dans la bactérie.              | Une impermeabilité de la bactérie par réduction de l'expression du gène codant pour les porines.  |

## B-5- mécanismes récents et mécanismes non conventionnels de résistance aux antibiotiques

### B-5-1-résistance à la colistine

La colistine est un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines, du groupe des polymyxines E, actifs sur les membranes phospholipidiques cellulaires. Elle est produite par certaines souches de *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. La colistine est un antibiotique ancien découvert en 1950 par des chercheurs japonais mais qui a ensuite été de moins en moins utilisée dans l'espèce humaine du fait de sa néphrotoxicité, tout en continuant à avoir un usage vétérinaire et en restant chez l'humain un médicament de dernier recours face à des germes multi-résistants aux antibiotiques tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter* notamment *Acinetobacter baumannii* [78].

En novembre 2015 a eu lieu la description du premier mécanisme génétique transférable de résistance à la colistine. Ce premier mécanisme est porté par le gène *mcr-1* décrit en Chine chez des porcs et des poulets, à partir de viande vendue au détail, ainsi que chez des souches bactériennes isolées chez l'humain. La prévalence de ce gène plasmidique a été estimée à environ 20% chez l'animal et autour de 1% chez l'humain [79].

La publication de la séquence génétique du gène *mcr-1a* a conduit plusieurs instituts à rechercher sa présence dans d'autres collections bactériennes à l'échelle mondiale. A ce jour, en Europe, le gène *mcr-1a* a été détecté dans des souches bactériennes d'*Escherichia coli* et/ou de *Salmonella enterica*, par le Laboratoire de Référence européen sur l'antibiorésistance animale (DTU, Danemark), par le Laboratoire de Référence en Santé Publique en Angleterre et par les quatre laboratoires de l'ANSES impliqués dans la surveillance de l'antibiorésistance animale. Dans toutes ces collections, la prévalence du gène *mcr-1* est particulièrement faible.

Par ailleurs, aucune augmentation alarmante de la résistance à la colistine des bactéries isolées des filières avicole et porcine n'a été enregistrée par les différents réseaux de surveillance de l'Anses au cours des dernières années [79]. La colistine était, jusqu'à récemment, l'antibiotique le plus épargné par la résistance chez les bactéries Gram négatives multirésistantes ; et parfois, la seule molécule active sur un *Acinetobacter baumannii* ou bien sur une *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase. Très récemment, des gènes de résistance plasmidiques à cet antibiotique (*gènemcr-1* et *gènemcr-2*) ont été décrits chez de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Salmonella*, *Escherichia coli*, ...) isolées en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud, en Afrique, au Danemark, au Royaume-Uni, au Portugal, mais aussi en France, surtout chez l'animal et dans une moindre mesure chez l'homme. Ceci nous met véritablement devant une impasse thérapeutique totale [80]

#### B-5-2-la résistance coopérative :

Le principe de cette résistance est énoncé de cette manière : des populations denses de bactéries résistent à l'éradication par des concentrations d'antibiotiques considérablement plus élevées que celles nécessaires pour tuer la même population à une densité plus faible par un phénomène connu sous le nom d '«effet inoculum» [81]. Un mécanisme d'efficacité de l'antibiotique dépendant de la densité est l'inactivation du médicament par des enzymes de résistance exprimées par des bactéries. La capacité collective de la population à inactiver le médicament dépend de plusieurs facteurs, y compris le nombre de cellules exprimant l'enzyme conférant la résistance. La résistance coopérative devrait donc être moins efficace aux petites tailles initiales de la population, ce qui entraînerait une différence entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'antibiotiques requise pour affecter les cellules individuelles et la CMI normale, généralement mesurée à l'aide d'inocula relativement élevés ( $10^6$  UFC/mL). Ce type de résistance présente des défis et des

opportunités pour la l'antibiothérapie. Cette coopération peut, en effet, être perturbée par divers comportements bactériens. Affaiblir les liens de coopération au sein de communautés collectivement résistantes peut donc réduire leurs effets protecteurs ; en particulier, les biofilms abordés pour perturber ces communautés et supprimer la protection du collectif, y compris les méthodes pour interférer avec la communication intercellulaire ou quorum sensing. Les bactéries dans les biofilms peuvent : 1) montrer une remarquable diminution de la sensibilité aux antibiotiques et autres toxines et 2) résister à des concentrations de médicaments beaucoup plus élevées que celles nécessaires pour tuer les bactéries libres à des densités comparables [82] [83] [84].

L'inhibition de la coopération microbienne est une voie prometteuse pour les régimes de traitement qui minimisent la résistance collective ; la poursuite de la découverte de nouveaux inhibiteurs et l'utilisation de ces composés contre les communautés récalcitrantes aux antibiotiques montreront à quel degré cette promesse est susceptible d'être réalisée [85].

### B-5-3-Le resistome :

Le microbiote intestinal, ensemble microbien complexe, se situe au centre du phénomène de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques. Il héberge en effet certaines bactéries multirésistantes comme les entérobactéries et les entérocoques, maintenues normalement à des densités faibles par l'effet barrière exercé par les bactéries anaérobies. Cependant, en cas d'altération du microbiote intestinal, par exemple suite à la prise d'antibiotiques, les densités intestinales des bactéries multirésistantes peuvent augmenter et ainsi accroître le risque que ces bactéries soient impliquées dans les infections, transmissions croisées et translocations. La protection du microbiote intestinal et notamment de l'effet barrière offre ainsi de nouvelles voies de lutte contre la multirésistance bactérienne [86]. Le terme

« résistome » intestinal est donné à l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques présents dans le microbiote intestinal. On peut diviser ce résistome en deux entités : le résistome endogène ou « résident » composé par les bactéries du microbiote résident de l'hôte, et le résistome exogène ou variable, composé par des gènes de résistance apportés par des bactéries en transit [87]. Assurer la préservation du microbiote intestinal serait ainsi un moyen efficace d'empêcher les bactéries multirésistantes de s'installer durablement. Parallèlement à une moindre fréquence de portage de bactéries multirésistantes, une réduction du risque d'infections à *Clostridium difficile* serait obtenue. Cela empêcherait aussi l'inactivation de l'antibiotique au niveau du côlon par un adsorbant ou une bêtalactamase, ce qui est également une stratégie positive. Enfin, si la transplantation fécale a montré chez l'animal, voire chez l'homme, son efficacité à diminuer les densités intestinales des bactéries multirésistantes, elle reste complexe et à confirmer [86] [88].

## C-Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques [25]

Dans son premier rapport annuel, le Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARSNet) devenu Système européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARSS) au Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) le 1er janvier 2010 ; suite à la série de rapports annuels publiés par le réseau depuis 2001 ; a souligné que la résistance aux antimicrobiens a progressivement pris une place de plus en plus importante dans le programme de santé publique en Europe. Cette surveillance a joué un rôle important pour documenter l'apparition et la propagation de la résistance aux antimicrobiens et sensibiliser les responsables de la santé publique au problème au niveau politique et dans la communauté scientifique.

Sur la base des données de 28 pays, la situation de résistance en Europe varie fortement selon le type de pathogène, la substance antimicrobienne et la région géographique. Les résultats de résistance les plus préoccupants provenaient de la diminution rapide de la sensibilité d'*E. coli* invasive et de la forte prévalence de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération, fluoroquinolones et les aminoglycosides (supérieure à 10%) ; et quelques pays rapportent des pourcentages élevés de résistance aux carbapénèmes. Ces antibiotiques ont été largement utilisés dans de nombreux pays en raison du taux croissant d'*Enterobacteriaceae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) avec un impact conséquent sur l'émergence de la production de carbapénémases (VIM, KPC et NDM-1), en particulier chez *K. pneumoniae*.

D'autres tendances dans la survenue de la résistance signalées à EARS-Net donnent l'espoir que les efforts nationaux de lutte contre l'infection et les efforts visant à endiguer la résistance peuvent, dans certains cas, stopper le développement de la résistance ou inverser les tendances de résistance indésirables. Le

développement de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA ou SARM). Même si la proportion de SARM chez *Staphylococcus aureus* est toujours supérieure à 25% dans 10 des 28 pays, l'apparition de SARM se stabilise ou diminue dans certains pays et une diminution soutenue a été observée en Autriche, France, Irlande, Lettonie et Royaume-Uni. Simultanément, la résistance aux aminoglycosides de haut niveau chez *Enterococcus faecalis* semble se stabiliser à un niveau relativement élevé. La majorité des pays ont signalé des proportions d'isolats résistants entre 30% et 50%.

Pour *Streptococcus pneumoniae*, la non-sensibilité à la pénicilline est généralement stable en Europe et la non-susceptibilité aux macrolides a diminué dans six pays alors qu'aucun pays n'a signalé de tendance à la hausse. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, de nombreux pays, en particulier en Europe méridionale et orientale, ont signalé de fortes proportions de résistance aux fluoroquinolones, aux carbapénèmes et à la résistance combinée.

Pour plusieurs combinaisons antimicrobiennes et pathogènes, par ex. la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et pour le SARM, un gradient nord-sud est évident en Europe. En général, des proportions plus faibles de résistance sont signalées dans le nord et des proportions plus élevées dans le sud de l'Europe reflétant probablement des différences dans les pratiques de contrôle des infections, la présence ou l'absence de législation sur la prescription d'antimicrobiens et d'autres facteurs connus.

Cependant, pour *K. pneumoniae*, des tendances croissantes de résistance à des classes d'antibiotiques spécifiques et de multirésistance ont également été observées dans les pays d'Europe du Nord.

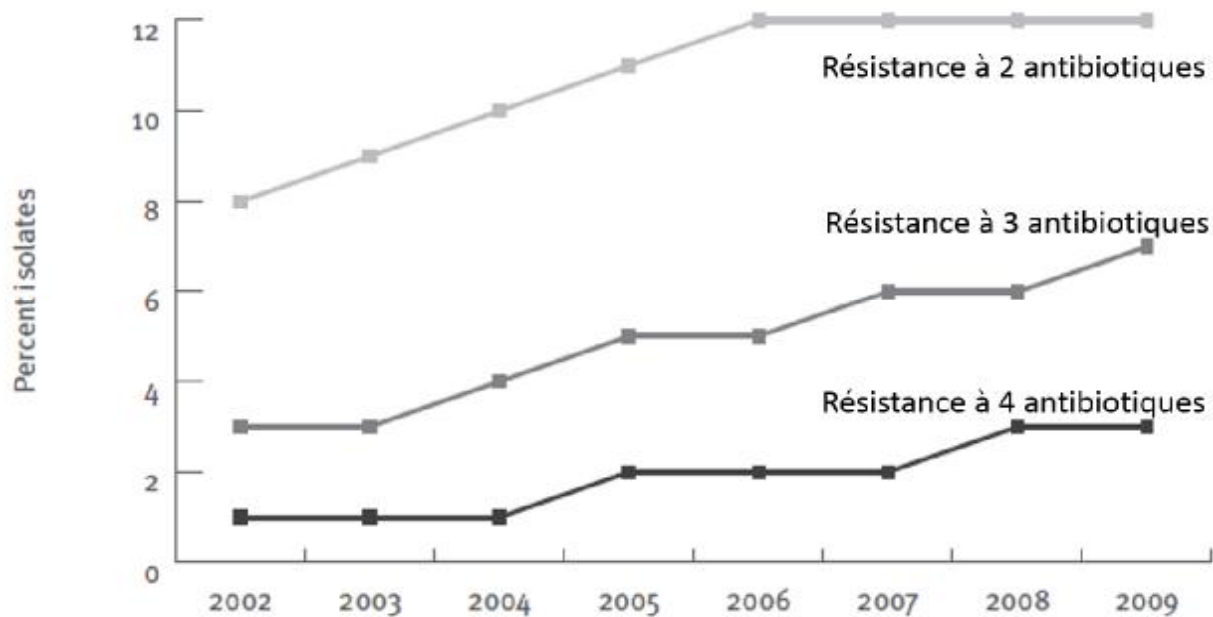


Figure 8 : Prévalence croissante de la multirésistance en Europe de 2002 à 2009 chez *Escherichia coli*



Figure 9 : Prévalence de MRSA (SARM) dans les infections invasives en Europe en 2009

Dans le dernier rapport de 2017 [8] l'état de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries objet de la surveillance a été résumé dans ce tableau suivant :

Tableau2 : l'état de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries objet de la surveillance en 2017

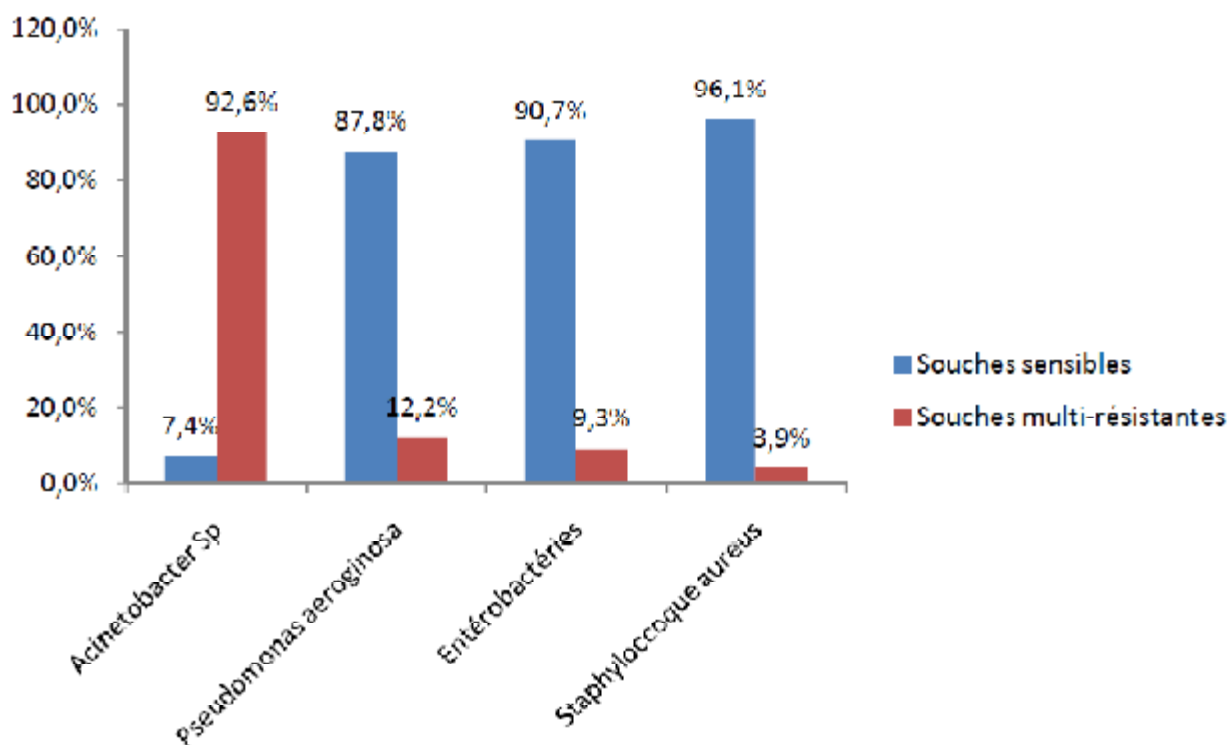
| Member state   | % MRSA | % 3GCR<br><i>E. coli</i> | %KP resistant to<br>AG, FQ and 3GC | % PRSP | % MRSP | % CRKP |
|----------------|--------|--------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| Austria        | 7.5    | 9.7                      | 3.3                                | 2.3    | 8.4    | 0.8    |
| Belgium        | 12.3   | 9.7                      | 9.3                                | 0.6    | 18.6   | 0.5    |
| Bulgaria       | 13.1   | 38.5                     | 28.6                               | 22.9   | 18.2   | 3.2    |
| Cyprus         | 43.4   | 28.5                     | 17.7                               | n.a    | n.a    | 12.9   |
| Czech Republic | 13.7   | 14.5                     | 41.5                               | 0.0    | 6.7    | 0.3    |
| Germany        | 11.2   | 10.4                     | 3.1                                | 1.7    | 7.9    | 0.1    |
| Denmark        | 1.6    | 7.5                      | 1.1                                | 0.9    | 5.2    | 0.0    |
| Estonia        | 4.0    | 11.4                     | 22.2                               | 2.8    | 7.4    | 0.0    |
| Greece         | 39.4   | 19.8                     | 46.7                               | n.a    | n.a    | 61.9   |
| Spain          | 25.3   | 11.6                     | 11.7                               | 23.5   | 21.2   | 2.2    |
| Finland        | 1.9    | 6.1                      | 1.1                                | 0.1    | 14.0   | 0.0    |
| France         | 15.7   | 11.0                     | 22.5                               | 0.3    | 24.4   | 0.5    |
| Croatia        | 24.5   | 12.5                     | 32.4                               | 19.0   | 19.0   | 2.4    |
| Hungary        | 24.7   | 16.7                     | 30.2                               | 2.2    | 10.6   | 0.1    |
| Ireland        | 18.1   | 11.4                     | 7.2                                | 0.3    | 13.9   | 0.5    |
| Iceland        | 0.0    | 1.7                      | 0.0                                | 4.0    | 12.0   | 0.0    |
| Italy          | 34.1   | 30.1                     | 29.7                               | 3.3    | 23.4   | 33.5   |
| Lithuania      | 8.5    | 16.0                     | 39.9                               | 5.7    | 12.5   | 0.0    |
| Luxembourg     | 8.9    | 12.7                     | 13.3                               | 0.0    | 0.0    | 0.0    |
| Latvia         | 5.6    | 17.9                     | 36.6                               | 3.4    | 5.2    | 0.0    |
| Malta          | 49.4   | 11.8                     | 14.8                               | 0.0    | 40.0   | 4.5    |

- Epidémiologie de la résistance bactérienne au Maroc à travers un exemple:  
[70]

Cet exemple a été choisi pour sa qualité et sa proximité en ce sens qu'il représente un état des lieux dans la région drainée par le CHU Hassan II de Fès.

Ce travail a porté sur les Bactéries Multirésistantes (BMR) impliquées dans tous types d'infections, donc isolées à partir de divers prélèvements cyto bactériologiques cliniques au Laboratoire Central de Microbiologie du CHU Hassan II de Fès pendant l'année 2012. Les résultats ont révélé que les Entérobactéries productrices de BLSE étaient les BMR les plus fréquemment isolées (n=199 ou 47%) ; suivies de *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème ou ABRI (n=163 ou 39%) ; puis

*Pseudomonas aeruginosa* résistant à la Ceftazidime ou PARC (n=38 ou 9%) ; et enfin du *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (n=18 ou 4%) et *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1) [...]. Aucun entérocoque résistant aux glycopeptides n'a été retrouvé. Les taux de multirésistance sont rapportés dans la figure 10.



[Figure 10 : Taux de BMR en fonction des espèces les plus fréquemment isolées au CHU Hassan II de Fès.](#)

[Source : Thèse 168/13, FMPF]

Ainsi, la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques est une menace d'envergure mondiale. En effet, les Nations Unies, à travers l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'est saisi du dossier en vue de sensibiliser les responsables politiques sur ce sujet inquiétant. Après la publication de son premier rapport, en avril 2014 sur la résistance bactérienne, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'alarme d'une « grave menace pour la santé publique » pointant l'inefficacité d'antibiotiques contre certaines bactéries. Selon l'organisme, celle-ci « n'est plus une prévision, mais bien une réalité dans chaque région du monde » [71].

Le rapport fait état de lacunes majeures dans le suivi de la résistance aux antibiotiques dans la région africaine de l'OMS, le Maroc en fait partie. Bien qu'il ne soit pas possible d'évaluer la véritable ampleur du problème, compte tenu du manque de données, celles dont on dispose sont inquiétantes. Pour avoir une vision globale sur cette problématique, un état des lieux s'impose et cela en se basant sur les résultats des études qui ont été menées dans les différentes villes du royaume.

Globalement, la perte d'activité touche des classes d'antibiotiques très variées et très différentes, mais on peut néanmoins faire état d'une famille particulièrement touchée, les bêta-lactamines. Ce problème est d'autant plus inquiétant qu'au Maroc, l'amoxicilline est parmi les antibiotiques les plus prescrits, tant en ville qu'à l'hôpital malgré le développement de nombreuses résistances.

- En milieu hospitalier : Les études réalisées dans différents hôpitaux du royaume sur le traitement des infections urinaires à E. Coli par l'amoxicilline soit seule soit en association avec l'acide clavulanique, ont montré que le taux de résistance de ce germe est entre 50 et 70%. Ainsi, en 2005, à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V de Rabat, le pourcentage de résistance d'E.coli à l'amoxicilline + acide clavulanique était de 50% [72] par contre il était de 60% à l'hôpital universitaire Cheikh Zayd de Rabat entre 2005 - 2007 [73]. Une autre étude réalisée à l'hôpital militaire de Marrakech entre 2009 et 2010 a révélé que, chez les nourrissons, le taux de résistance de ce germe était de 69% à l'amoxicilline seule et de 55% pour cet antibiotique en association avec l'acide clavulanique [74]. Ce pourcentage était de 67% au CHU de Fès pour l'association amoxicilline / acide clavulanique [75] - En ville : La croissance de l'antibiorésistance d'E.Coli lors des infections communautaires est un phénomène inquiétant. Les résultats de l'étude faite à El Jadida par Nadmia et al montre que le pourcentage de résistance de ce germe à l'amoxicilline est de 61% [76].

A Meknès, Lahlou-Amine et al [180] ont étudié la résistance aux antibiotiques dans les infections urinaires à l'Hôpital Militaire Moulay Ismail. Sur 6000 échantillons

urinaires, 730 répondaient aux critères d'infection urinaire (12,2 %). Parmi les infections, 30 % provenaient de patients hospitalisés et 70 % de patients consultant en ambulatoire. *Escherichia coli* domine le profil épidémiologique aussi bien pour les entérobactéries hospitalières que communautaires avec respectivement 65 et 80 % des isolats. La fréquence de la résistance globale des souches d'entérobactéries hospitalières et communautaires est donnée dans le tableau ci-dessous :

*Percentage of resistance to antibiotics of Enterobacteriaceae according to their nosocomial or community origin.*

| Antibiotiques                     | Souches nosocomiales<br>n = 219<br>(%) | Souches communautaires<br>n = 511<br>(%) |
|-----------------------------------|--|--|
| Amoxicilline                      | 90                                     | 80                                       |
| Amoxicilline + acide clavulanique | 75                                     | 70                                       |
| Céfalotine                        | 93                                     | 80                                       |
| Céfuroxime                        | 61                                     | 45                                       |
| Céfotaxime                        | 33                                     | 1,17                                     |
| Acide nalidixique                 | 55                                     | 45                                       |
| Ciprofloxacine                    | 40                                     | 36                                       |
| Gentamicine                       | 40                                     | 25                                       |
| Amikacine                         | 13                                     | 11                                       |
| Sulfaméthoxazole + trimethoprim   | 60                                     | 65                                       |
| Nitrofuranes                      | 45                                     | 50                                       |

D'après les mêmes auteurs, la répartition des entérobactéries nosocomiales productrices de BLSE est précisée dans le tableau suivant :

*Repartition of nosocomial Enterobacteriaceae producing ESBL.*

| Espèces d'entérobactéries   | Nombre de souches | Pourcentage |
|-----------------------------|-------------------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i>     | 34                | 56          |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 13                | 22          |
| <i>K. pneumoniae</i>        | 10                | 17          |
| Autres entérobactéries      | 03                | 05          |
| Total                       | 60                | 100         |

Une étude réalisée à Marrakech en 2012 par El Bouamri et coll [181] dans un service d'urologie pour mettre en évidence les résistances chez les entérobactéries productrices de BLSE dans un service d'urologie. L'étude a montré des co-résistances de 82% à la ciprofloxacine, de 85% à la combinaison sulfaméthoxazole/triméthopime, de 74% à la gentamycine et de 51% à l'amikacine. Leurs résultats ont souligné aussi, pour la première fois (2012) dans cette région, une émergence de la résistance aux carbapénèmes, à hauteur de 10%. (Figure 11)

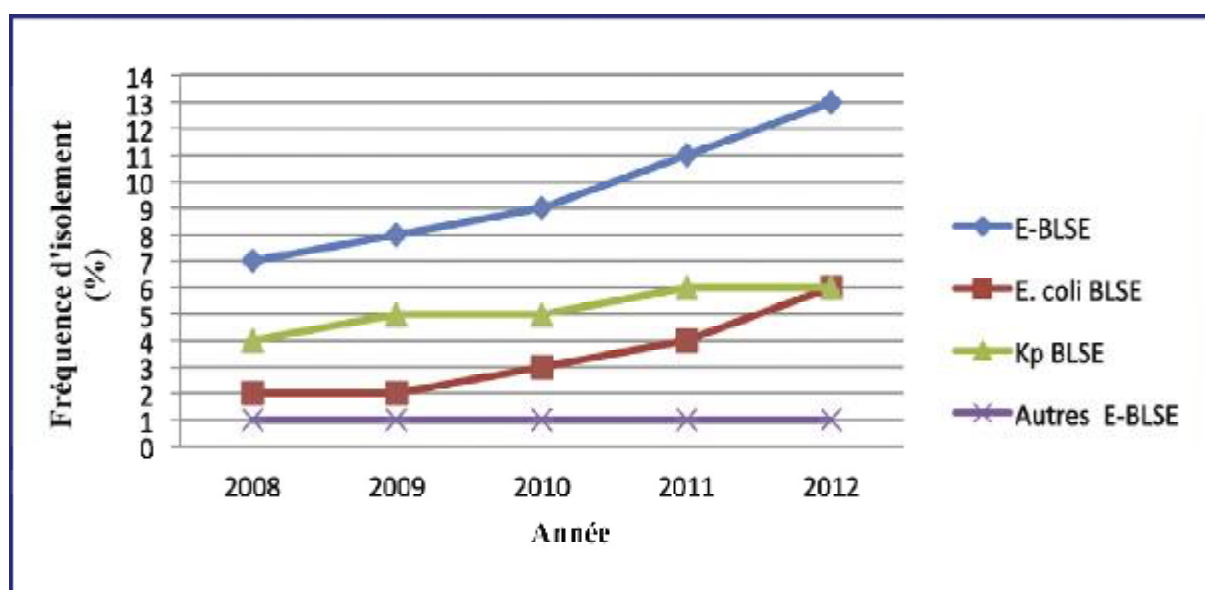


Figure 11 : évolution de la fréquence d'isolement des EBLSE à l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech de 2008 à 2012

[Source : El Bouamri MC et al. 2014]

Afin de pouvoir émettre des conclusions sur l'état actuel de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans notre pays, il faudrait avoir un échantillon statistiquement valable. Malgré le nombre faible des échantillons des études citées précédemment, le taux de résistance trouvés reste élevé. En effet, si on compare la situation de la sensibilité d'E.Coli dans notre pays et celle des pays développés, le constat est contrasté. Les résultats publiés par les réseaux de surveillance de la sensibilité aux antibiotiques en Europe ou en Amérique du Nord (The Surveillance Network) sont superposables : Pour Escherichia coli le taux de résistance à l'ampicilline varie de 25 à 35%, de 2 à 10% pour l'association aminopénicilline-inhibiteur de bêta-lactamase [77].

### III. MOYENS DE DETECTION DE LA RESISTANCE BACTERIENNE :

#### A-méthodes phénotypiques :

##### A-1-L'antibiogramme :

##### A-1-1-Introduction :

L'antibiogramme consiste à déterminer la sensibilité et la résistance aux antibiotiques d'une bactérie isolée dans un prélèvement, et supposée être à l'origine d'un processus infectieux. Il s'agit d'une aide au choix du traitement d'une infection qui ne doit être réalisé qu'à bon escient, c'est-à-dire lorsqu'il existe une forte probabilité que la bactérie isolée soit impliquée dans le processus infectieux. Sa réalisation pour une bactérie non pathogène engage la responsabilité du biologiste car elle peut inciter le clinicien à un traitement inutile, voire dangereux pour le patient, et s'il est relativement aisé d'identifier les situations où l'antibiogramme est utile, voire obligatoire, il est parfois beaucoup plus délicat d'identifier celles où il est inutile. Enfin, le traitement d'une infection par un antibiotique décrié actif par un antibiogramme ne garantit pas le succès thérapeutique, alors qu'utiliser un antibiotique auquel la bactérie est résistante est synonyme d'échec [89].

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles [90].

Sa réalisation est laissée à l'initiative du biologiste, en tenant compte des recommandations des Sociétés Savantes et des molécules disponibles. Il doit être pratiqué en raison de la qualité (la nature), de la densité (le dénombrement) de l'espèce ou des espèces isolées, soit de l'état clinique du patient ou du siège de l'infection sur les espèces susceptibles d'engendrer un processus infectieux.

En pratique, on étudie l'effet des antibiotiques *in vitro* le plus souvent et dans des conditions normalisées de culture. Ainsi, il faut déterminer des corrélations afin de présumer de l'efficacité *in vivo* de l'antibiotique et donc de la réussite (ou de l'échec) du traitement sur la base de données biologiques *in vitro*.

#### A-1-2-bactériostase et bactéricidie :

##### A-1-2-a-Bactériostase et La concentration minimale inhibitrice :

La bactériostase correspond à un ralentissement de la croissance d'une population bactérienne, pouvant aller jusqu'à l'arrêt de celle-ci. Cette définition n'a de valeur que lorsque la bactérie était en phase de croissance avant le contact. Dans le cas contraire une absence de développement peut aussi correspondre à une augmentation très prononcée du temps de latence.

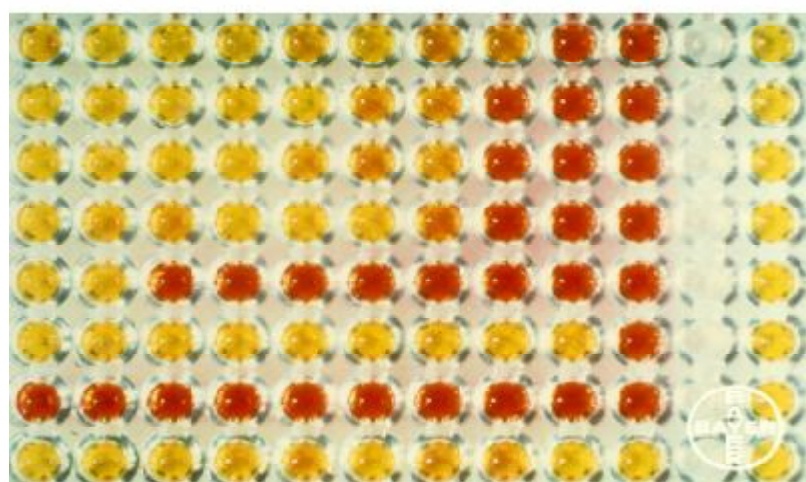
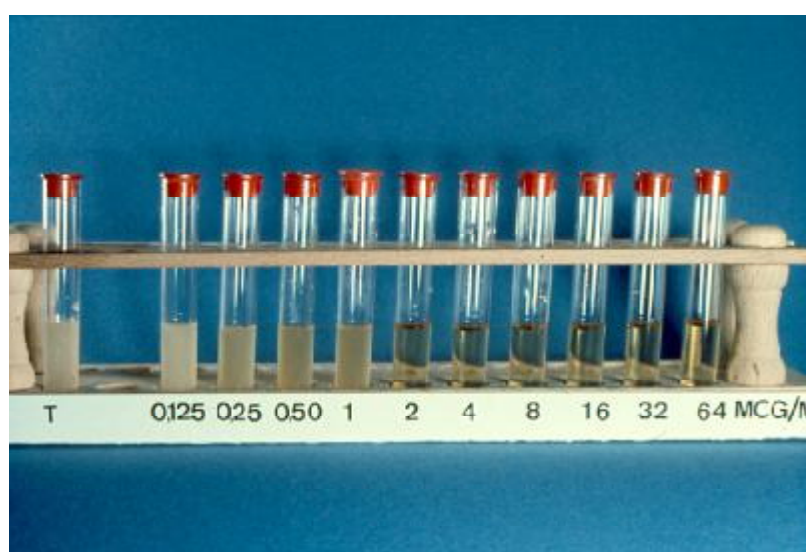
La concentration minimale inhibitrice (CMI) est paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique. Elle correspond à la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24H pour les bactéries à multiplication rapide (absence de l'augmentation du nombre de bactéries). La CMI explore donc l'effet bactériostatique seulement, ce qui n'est pas limitatif sachant qu'en bactériologie clinique, le but le plus souvent recherché est l'inhibition de la prolifération bactérienne, dans la mesure où l'organisme, via son système inflammatoire et immunitaire, est capable de se défendre contre les bactéries (La CMI n'est pas justifiée chez un malade immunodéprimé comme paramètre de prédiction d'activité).

Il existe de bonnes corrélations biologico-cliniques de l'emploi de la CMI, qui, après plusieurs dizaines d'années d'expérience s'avère être un bon prédicateur de l'efficacité de la thérapeutique antibiotique : Quand elle excède une certaine valeur l'échec thérapeutique est habituel : quand elle est inférieure à une valeur seuil, le succès est pratiquement assuré. Entre les deux valeurs précédentes, la prédiction est périlleuse.

Sa détermination fait appel aux méthodes de dilutions successives en milieu liquide ou solide.

- En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes contenant l'antibiotique, après incubation la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible. Cette méthode peut être réalisée en microplaque, donc automatisable [89].



*Images de Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide :*

*(En haut) : macro-méthode en tubes (En bas) : micro-méthode en plaque de microtitration (jaune : croissance +, rouge : absence de croissance)*

[source : F. Jehl , A. Chabaud, A. Grillon. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ?  
Journal des Anti-infectieux (2015) 17, 125—139.]

- Détermination de la CMI en milieu solide :

Des dilutions de l'antibiotique à tester sont incorporées dans un milieu gélosé coulé en boîtes de pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches dont on veut mesurer la CMI. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par la concentration d'antibiotique présente dans la première boîte dont la culture est stérile pour la souche donnée.

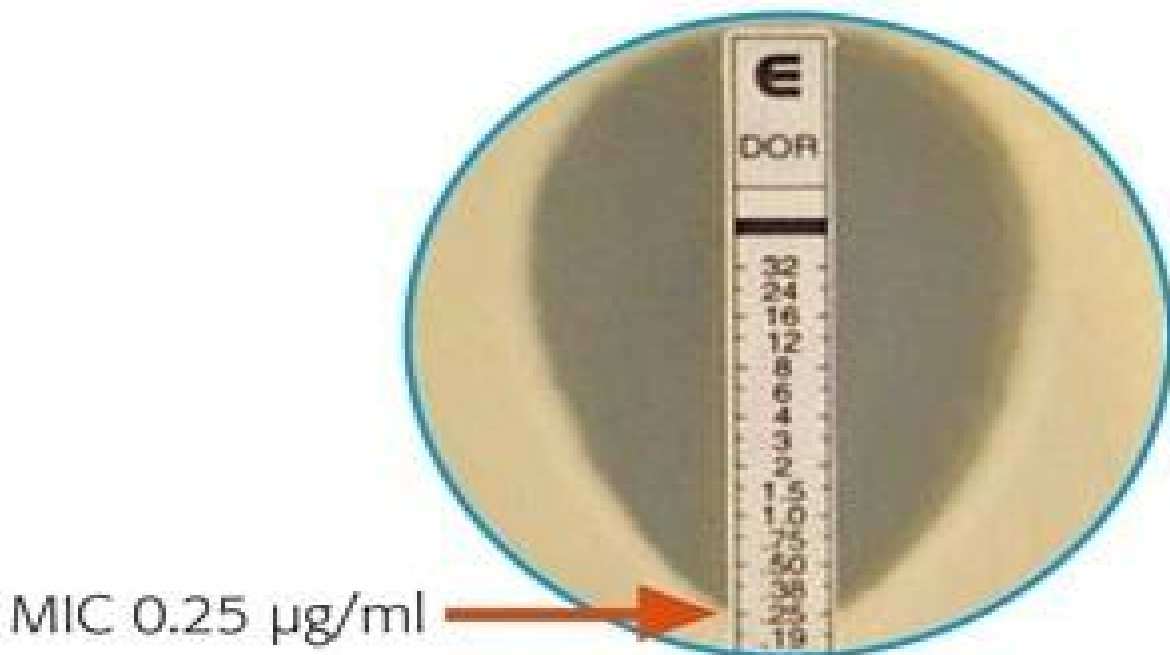


Détermination de la CMI par dilution en milieu solide : dépôt de souches en spot par un inoculateur à peigne type Steers stérilisable à la flamme avec effet Peltier

[Tirée de : <http://docplayer.fr/43699474-Etude-in-vitro-de-la-sensibilite-des-bacteries-aux-antibiotiques.html>]

•E-test=l'épsilomètre: [91]

Une technique rapide et simple qui permet de déterminer la CMI, grâce à des bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu d'ATB à tester. La bandelette est appliquée sur la surface d'un milieu gélosé (celui recommandé pour les antibiogrammes par diffusion) préalablement ensemencé avec inoculum de la souche à étudier. Après 18 heures d'incubation, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme. La CMI correspond alors à la concentration d'ATB lisible au point où l'ellipse croise la bandelette.






[Détermination de la CMI par epsilon-Test \(E-test\)](#)

[\[https://www.google.com/search?q=epsilometer&source=lnms&tbm=isch&s\]](https://www.google.com/search?q=epsilometer&source=lnms&tbm=isch&s)

- Détermination automatisée de la CMI :

L'automatisation de l'antibiogramme a connu un développement considérable depuis les années 1980. Actuellement, l'automatisation de la méthode par diffusion repose sur des lecteurs automatiques de diamètres de zones d'inhibition comme l'Adagio (BioRad) et la gamme Sirscan (i2a). La méthode par microdilution en bouillon peut être réalisée avec des microplaques contenant des dilutions sériées d'antibiotiques prêtes à l'emploi (Sensititre, Microscan) et des systèmes semi-automatisés incluent un lecteur automatique de CMI (Optiread, Autoscan 4). Des systèmes entièrement automatisés, qui gèrent l'incubation, la décision de lecture et la lecture elle-même, sont proposés. Ces automates à antibiogramme comprennent des systèmes qui sont une adaptation directe de la méthode de référence, comme le MicroScanWalkAway et l'ARIS 2X. Le Phoenix s'en rapproche (lecture colorimétrique de la croissance bactérienne, incubation d'environ 12 h). Le Vitek 2 est basé sur un principe différent (calcul des CMI à partir d'un algorithme appliqué à la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique, incubation de 6-8 h). L'automatisation de l'antibiogramme a considérablement réduit le temps de travail et, pour les systèmes rapides, accéléré la réponse au clinicien. De plus, l'automatisation a significativement amélioré la fiabilité des résultats grâce à la standardisation des réactifs et de la procédure et à l'informatisation qui évite les erreurs de catégorisation et de transcription. L'exactitude des systèmes (semi)automatisés est satisfaisante pour *Staphylococcus aureus* et les entérobactéries. Des progrès sont nécessaires pour les autres bactéries non exigeantes. La méthode par diffusion reste indispensable pour les espèces à croissance difficile [92].

| Phenis de BD™   | Vitek 2 de BioMérieux™  | MicroscanWalkAway de Beckman  |
|---|---|---|
|  |  |  |

Ces automates de bactériologie assurent les conditions techniques et informatiques pour l'identification des bactéries et levures d'intérêt médical [93], ainsi que la mesure de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (antifongiques pour les levures) en donnant le résultat très rapidement (après 4h d'incubation) pour les bactéries les plus courantes. Des panels de tests biochimiques d'identification combinés à des gammes de dilutions de divers antibiotiques encadrant les concentrations critiques permettent de donner les résultats interprétés en S, I ou R assortis des CMI nécessaires à la décision et au choix thérapeutiques. En plus, les galeries permettent : 1) le contrôle de la concordance « galerie-groupe bactérien testé », 2) le contrôle de l'identification par des antibiotiques de résistance naturelle et 3) la détection de phénotypes particuliers de résistance, notamment les BLSE, les carbapénémases, ... [94] [95] [96][97]. L'informatique gérant ces automates permet la traçabilité, les statistiques, les alertes contre les BMR, le suivi de l'épidémiologie. Des panels spécialement dédiés pour CMI sont également proposés par chaque firme. C'est la technique la plus fréquemment utilisée dans les laboratoires de diagnostic à l'heure actuelle, comme au laboratoire central de Microbiologie-Sérologie du CHU Hassan II de Fès.

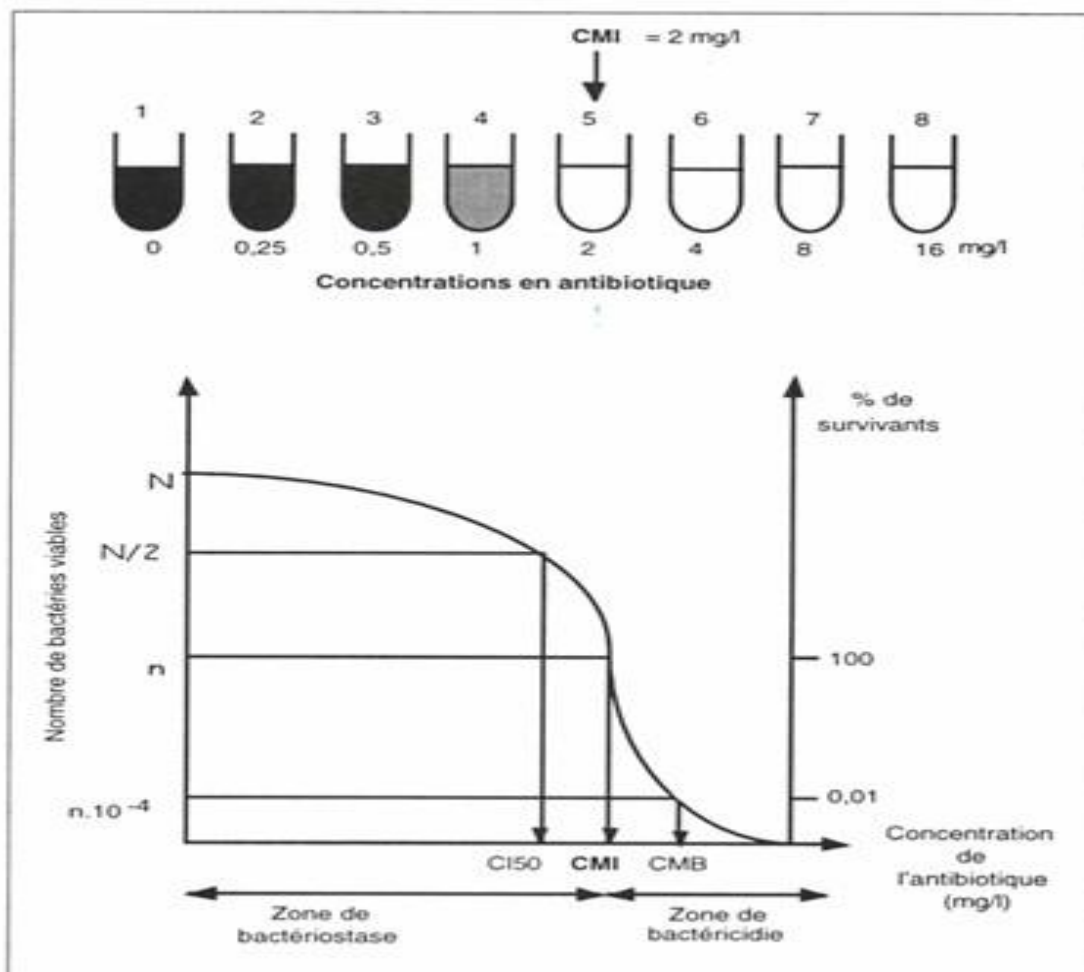
*A-1-2-b-La Bactéricidie et les concentrations minimales bactéricides (CMB) :*

La CMB est définie par la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister que 0,01% (1/10<sup>4</sup>) ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique. Elle est toujours supérieure à la CMI.

Selon leur activité, les antibiotiques sont classés en bactériostatiques ou bactéricides : [92]

-Antibiotiques bactériostatiques : CMB éloignée des CMI : le rapport CMB/CMI étant > 32. Exemple d'antibiotiques bactériostatiques : macrolides, tétracyclines, rifamycines, sulfamides.

-Antibiotiques bactéricides : CMB proches des CMI : CMB/CMI < 32. Les aminosides, les β-lactamines, les quinolones et les glycopeptides sont des antibiotiques bactéricides.



$n$  = nombre initial de bactéries viables  
 $N$  = nombre final de bactéries viables  
 CI50 = concentration inhibitrice 50 %  
 CMI = concentration minimale inhibitrice  
 CMB = concentration minimale bactéricide

Figure 12: Courbe représentant CMI et CMB

[D'après CATTOIR V. Etude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Cours de DCEM1 - Faculté de Médecine de Créteil. 2006]

### A-1-3-L'antibiogramme standard: [98] [91] [89]

L'antibiogramme est un test particulier en biologie clinique car il s'adresse à des êtres vivants infectieux et non au corps humain. Il constitue l'outil de mesure de la résistance bactérienne. Sa pratique et son interprétation font appel à de nombreuses connaissances cliniques, pharmaceutiques, bactériologiques, biochimiques et génétiques.

L'antibiogramme est un test de prédiction, totalement artificiel, complexe, à interprétation obligatoire, à impact variable et dont le résultat intéresse plusieurs destinataires.

L'interprétation se fait aujourd'hui avec des systèmes experts qui suivent les recommandations de comités d'antibiogramme. Le choix des antibiotiques testés a beaucoup évolué en fonction des connaissances. L'impact médical est de plusieurs ordres : impact immédiat (traitement du malade concerné et alerte à la résistance), impact différé (traitements empiriques), collectif (surveillance de la résistance) et impact didactique [99].

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic en raison de leurs avantages techniques et économiques. Cette méthode porte le nom de technique de Kirby et Bauer. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme (à 360°) selon les lois de Fick. La relation diamètre d'inhibition et concentration d'antibiotique sont mathématiquement corrélées, si bien qu'il existe une droite dégressive entre les logarithmes de base 2 des concentrations et les diamètres des zones d'inhibition (en mm) [96].

À la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, si les droites de concordance (ou de régression) entre diamètres d'inhibition et  $\log_2$  CMI (établies par des laboratoires spécialisés travaillant dans des conditions standardisées) sont disponibles, elles permettront de déterminer la CMI de l'antibiotique considéré vis-à-vis de la souche testée.

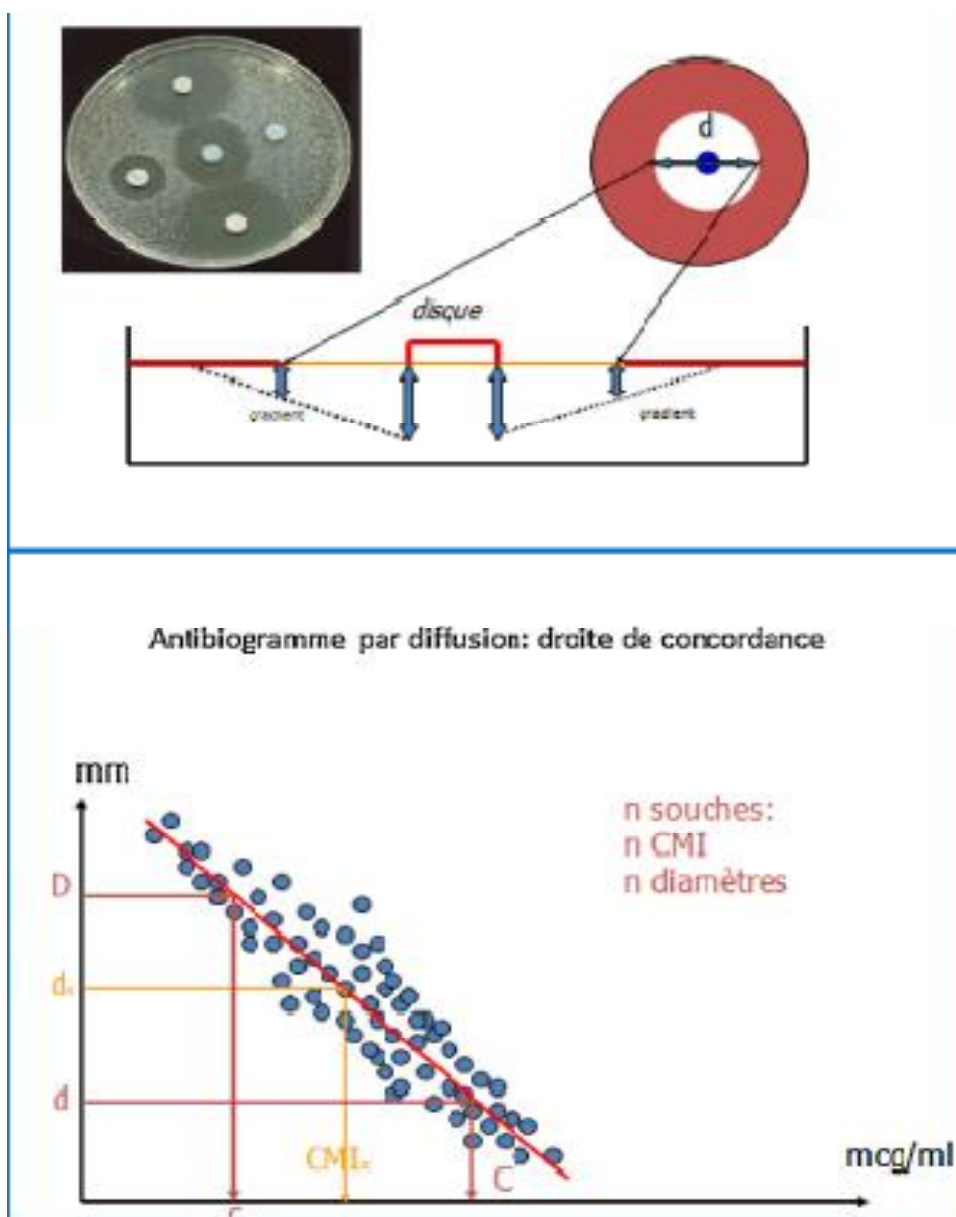


Figure13 : Concordance CMI et diamètres d'inhibition

[Jehl F, Chabaud A. Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-infectieux* (2015) 17, 125—139]

À la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, si les droites de concordance (ou de régression) entre diamètres d'inhibition et  $\log_2$  CMI (établies par des laboratoires spécialisés travaillant dans des conditions standardisées) sont disponibles, elles permettront de déterminer la CMI de l'antibiotique considéré vis-à-vis de la souche testée [89].

#### A-1-3-a-Conditions techniques :

Suite aux recommandations du Comité d'Experts de Standardisation biologique de l'OMS (1979), la Société Française de Microbiologie a créé un Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) chargé de déterminer les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques ; et proposer un guide pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Ainsi, les valeurs critiques définies pour les concentrations et les diamètres des zones d'inhibition, ainsi que les recommandations spécifiques à certaines espèces ou à certains groupes d'antibiotiques sont publiées dans un communiqué annuel par le CA-SFM.

Aux États-Unis, le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) a supplanté le NCCLS dans la standardisation des techniques d'antibiogramme. Chaque pays européen dispose de son comité et son institution de standardisation. Actuellement, le comité européen (EUCAST) tend à supplanter les organismes nationaux [100].

Au Maroc, en 2009, a été créée la Société Marocaine de Microbiologie Médicale (SMAMM) dont les membres du bureau et du comité de l'antibiogramme (CA-SMAMM), qui, outre les manifestations scientifiques périodiques, ils s'attachent à la standardisation de l'antibiogramme marocain en tenant compte de l'épidémiologie bactérienne nationale et des antibiotiques disponibles dans le commerce [101].

La réalisation de l'antibiogramme se fait par étapes :

- ✚ La préparation de l'inoculum bactérien
- ✚ Ajustement de la turbidité (densité) de l'inoculum
- ✚ Ensemencement et séchage des boîtes
- ✚ Disposition des disques ATB
- ✚ Incubation
- ✚ Lecture et interprétation des antibiogrammes

*Tableau 3 : milieux requis pour antibiogramme de diffusion sur gélose*

| <b>Tableau 1 Milieux de détermination la sensibilité des bactéries aux antibiotiques</b> |  |
|--|--|
| Organisme  | Milieu                                   |
| Entérobactéries  | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Pseudomonas</i> spp.  | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Acinetobacter</i> spp.  | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Staphylococcus</i> spp.   | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Enterococcus</i> spp.   | Gélose de Mueller-Hinton                 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>  | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| Streptocoques des groupes A, B, C, G   | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| Streptocoques du groupe viridans   | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| <i>Haemophilus</i> spp.  | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i>   | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| <i>Pasteurella multocida</i>   | Gélose MH-F <sup>1</sup>                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>C. coli</i>  | Gélose MH-F <sup>1</sup> (voir Annexe A) |
| Autres bactéries à croissance lente  | Selon                                    |

<sup>1</sup> MH + 5% sang de cheval défibriné mécaniquement + 20 mg/L β-NAD

[Tirée de : EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 3.0 (Août 2013) version française. [www.eucast.org](http://www.eucast.org)]

**Tableau 4 : Critères de catégorisation de la sensibilité de *Staphylococcus* spp selon les valeurs critiques des CMI et des diamètres de zones d'inhibition de l'EUCAST**

2017

| <b>Staphylococcus spp.</b>                                    |                       |      |                   |                               |                   |
|---|-----------------------|------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Fluoroquinolones <sup>1</sup>                                 | MIC breakpoint (mg/L) |      | Disk content (µg) | Zone diameter breakpoint (mm) |                   |
|   | S ≤                   | R >  |                   | S ≥                           | R <               |
| Ciprofloxacin <sup>2</sup> , <i>S. aureus</i>                 | 1                     | 1    | 5                 | 21 <sup>A</sup>               | 21 <sup>A</sup>   |
| Ciprofloxacin <sup>2</sup> , Coagulase-negative staphylococci | 1                     | 1    | 5                 | 24 <sup>A</sup>               | 24 <sup>A</sup>   |
| Levofloxacin, <i>S. aureus</i>                                | 1                     | 1    | 5                 | 22 <sup>A</sup>               | 22 <sup>A</sup>   |
| Levofloxacin, Coagulase-negative staphylococci                | 1                     | 1    | 5                 | 24 <sup>A</sup>               | 24 <sup>A</sup>   |
| Moxifloxacin, <i>S. aureus</i>                                | 0.25                  | 0.25 | 5                 | 25 <sup>A</sup>               | 25 <sup>A</sup>   |
| Moxifloxacin, Coagulase-negative staphylococci                | 0.25                  | 0.25 | 5                 | 28 <sup>A</sup>               | 28 <sup>A</sup>   |
| Nalidixic acid (screen)                                       | NA                    | NA   |                   | NA                            | NA                |
| Norfloxacin (screen)  | NA                    | NA   | 10                | 17 <sup>B</sup>               | Note <sup>B</sup> |
| Ofloxacin <sup>3</sup> , <i>S. aureus</i>                     | 1                     | 1    | 5                 | 20 <sup>A</sup>               | 20 <sup>A</sup>   |
| Ofloxacin <sup>3</sup> , Coagulase-negative staphylococci     | 1                     | 1    | 5                 | 24 <sup>A</sup>               | 24 <sup>A</sup>   |
| <b>Aminoglycosides<sup>1</sup></b>                            |                       |      |                   |                               |                   |
|   | MIC breakpoint (mg/L) |      | Disk content (µg) | Zone diameter breakpoint (mm) |                   |
|   | S ≤                   | R >  |                   | S ≥                           | R <               |
| Amikacin <sup>2</sup> , <i>S. aureus</i>                      | 8                     | 16   | 30                | 18                            | 16                |
| Amikacin <sup>2</sup> , Coagulase-negative staphylococci      | 8                     | 16   | 30                | 22                            | 19                |
| Gentamicin, <i>S. aureus</i>                                  | 1                     | 1    | 10                | 18                            | 18                |
| Gentamicin, Coagulase-negative staphylococci                  | 1                     | 1    | 10                | 22                            | 22                |
| Netilmicin, <i>S. aureus</i>                                  | 1                     | 1    | 10                | 18                            | 18                |
| Netilmicin, Coagulase-negative staphylococci                  | 1                     | 1    | 10                | 22                            | 22                |
| Tobramycin, <i>S. aureus</i>                                  | 1                     | 1    | 10                | 18                            | 18                |
| Tobramycin, Coagulase-negative staphylococci                  | 1                     | 1    | 10                | 22                            | 22                |

[EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017.

<http://www.eucast.org>.]

Aux regards des concentrations et des diamètres critiques sont considérées comme :

- ✚ sensibles (S), les souches pour lesquelles la CMI de l'antibiotique testé est inférieure ou égale à la concentration critique basse (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique D.
- ✚ résistantes (R), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique haute (C), correspondant à un diamètre strictement inférieur au diamètre critique d.
- ✚ de sensibilité intermédiaire (I), les souches vis-à-vis desquelles la CMI de l'antibiotique testé et le diamètre correspondant sont compris entre les deux concentrations critiques et les deux diamètres critiques.

À chaque antibiotique est associée une liste d'espèces bactériennes qui constitue le "spectre d'activité" de la molécule. Le spectre naturel, établi dans les premières études avant tout emploi en thérapeutique, reste stable par définition puisqu'il ne prend pas en compte la proportion de bactéries ayant acquis une résistance à l'antibiotique après son utilisation. Cette proportion augmente au cours du temps parce que l'emploi de l'antibiotique exerce la pression de sélection nécessaire à l'émergence de mutants ou de souches porteuses de facteurs extra-chromosomiques de résistance. Cette notion doit être connue du clinicien car elle explique des situations d'apparence paradoxale. Par exemple, le spectre naturel de la pénicilline G comprend *Staphylococcus aureus* alors que 90% des souches sont actuellement résistantes par production de pénicillinase.

Pour faciliter le choix d'un traitement antibiotique, les espèces bactériennes ont été réparties en 3 classes :

- Espèces habituellement sensibles ;
- Espèces modérément sensibles ;
- Espèces résistantes.

🚩 Les espèces habituellement sensibles : il s'agit d'espèces répondant à la répartition suivante :

90% ou plus des souches sont caractérisées par des CMI  $< c$ . Moins de 10 % des souches sont résistantes ou de sensibilité diminuée.

Ex : pénicilline G et streptocoque A.

🚩 Les espèces modérément sensibles : il s'agit d'espèces dont la sensibilité naturelle n'a pas été modifiée par la résistance mais qui sont habituellement classées résistantes par l'antibiogramme : 90% et plus des souches se situent dans la catégorie I. Le classement ne dépend pas d'un mécanisme de résistance acquis (dont la fréquence peut évoluer), mais d'un caractère propre à l'espèce. Ex : macrolides et *Haemophilus influenzae*.

🚩 Les espèces résistantes : il s'agit d'espèces pour lesquelles plus de 50% des souches sont résistantes. Cette résistance peut être naturelle ou acquise.

L'antibiogramme ne fait que confirmer la résistance s'il s'agit d'une résistance naturelle et participe ainsi à l'identification de l'espèce bactérienne. Il permet de suivre son évolution s'il s'agit d'un mécanisme acquis.

Ex : pénicilline G et *S. aureus* / aminosides et streptocoques. [72]

### Spectre d'activité d'un antibiotique : classification d'une espèce bactérienne

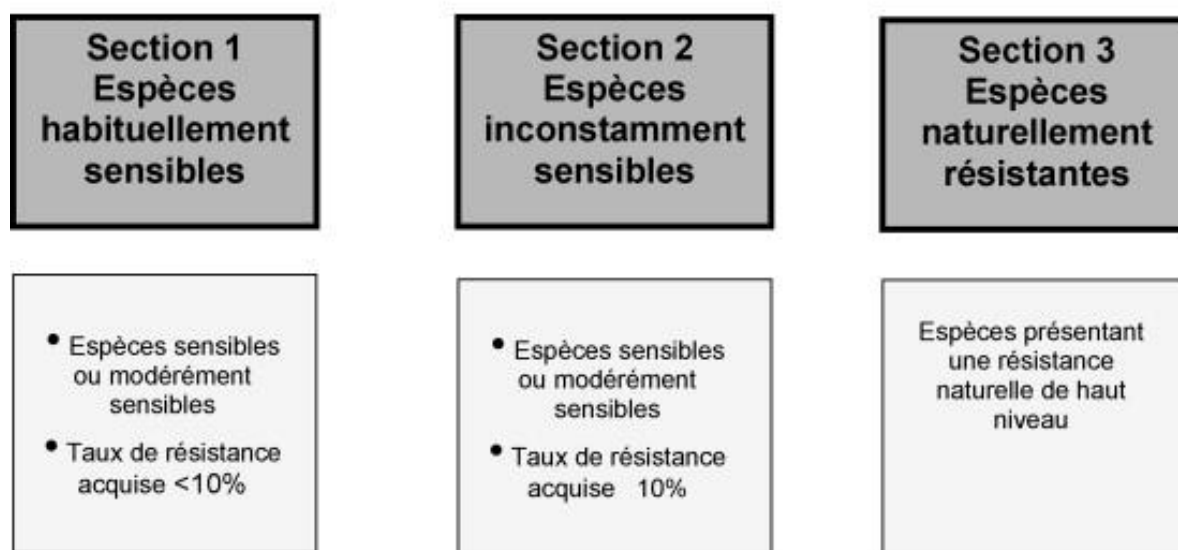


Figure 14 : catégorisation de spectre d'activité d'un antibiotique

[Source : Cavallo JD. Mérens A. Spectre d'activité antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique. Pathologie Biologie. Volume 56, Issue 5, July 2008, Pages 300-304]

- Contrôle de qualité: [102]

Les contrôles de qualité devraient accompagner toutes méthodes d'étude de la sensibilité des bactéries in vitro. L'image ci-dessous dresse la liste de souches de référence recommandées par l'EUCAST.

Tableau5 : souches de référence recommandées pour le contrôle qualité de l'antibiogramme

**TABLE 1. Strains recommended by EUCAST for routine quality control**

| Organism                        | Strain collection number   | Characteristics  |
|---------------------------------|--|--|
| <i>Escherichia coli</i>         | ATCC 25922<br>NCTC 12241<br>CIP 76.24<br>DSM 1103<br>CCUG 17620<br>CECT 434  | Susceptible, wild type                                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | ATCC 27853<br>NCTC 12903<br>CIP 76.110<br>DSM 1117<br>CCUG 17619<br>CECT 108 | Susceptible, wild type                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | ATCC 29213<br>NCTC 12973<br>CIP 103429<br>DSM 2569<br>CCUG 15915<br>CECT 794 | Weak $\beta$ -lactamase producer                       |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    | ATCC 29212<br>NCTC 12697<br>CIP 103214<br>DSM 2570<br>CCUG 9997<br>CECT 795  | Susceptible, wild type                                 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC 49619<br>NCTC 12977<br>CIP 104340<br>DSM 11967<br>CCUG 33638            | Low-level, chromosomally mediated penicillin resistant |
| <i>Haemophilus influenzae</i>   | NCTC 8468<br>CIP 54.94<br>CCUG 23946   | Susceptible, wild type                                 |

ATCC, American Type Culture Collection, USA; NCTC, National Collection of Type Cultures, UK; CIP, Collection de Institut Pasteur, France; DSM, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany; CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg, Sweden; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Spain.

[Matuschek E, Brown D. F. J. Kahlmeter G..Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect 2014; 20: O255–O266]

- limites de l'antibiogramme : [91]

∅ Limites techniques :

La réalisation d'un antibiogramme est soumise au respect de conditions techniques qui sont parfois incomplètement et insuffisamment respectées.

Un antibiogramme réalisé de manière non standardisée et sur un mélange de germes non identifiés est dépourvu de sens.

Tout laboratoire devrait vérifier la validité de sa technique en testant, au moins une fois par mois, la sensibilité des souches de référence et vérifier que les diamètres des zones d'inhibition obtenues vis-à-vis des divers antibiotiques sont conformes aux valeurs publiées par le Comité de l'Antibiogramme.

Les techniques de l'antibiogramme ont été standardisées uniquement pour les bactéries cultivant rapidement sur milieux usuels. Lorsque la souche isolée ne rentre pas dans ce cadre, l'interprétation est parfois délicate.

Les causes d'erreur :

- ✚ Composition du milieu.
- ✚ L'inoculum.
- ✚ L'épaisseur de gélose et caractère plan des boîtes plastiques.
- ✚ Atmosphère d'incubation.
- ✚ Temps de croissance des bactéries.
- ✚ Stockage et péremption des disques.
- ✚ Durée d'incubation

A-1-3-b-Recherches complémentaires:

ü Recherche de B lactamases type pénicillinase: [103]

La détection de la résistance bactérienne aux pénicillines (G et A) n'est pas toujours bien exprimée sur antibiogrammes (cas de *Neisseria*, *Haemophilus*, *Staphylococcus*, ...). Il faut alors recourir à des méthodes de mise en évidence plus ou moins simples de ces pénicillinases. Plusieurs techniques sont proposées :

Ø Techniques chromogéniques (test céfinase) :

Une méthode simple de mise en évidence rapide de ces enzymes : la méthode à la céphalosporine chromogène. Le test Céfinase est réalisé grâce à un disque imprégné d'un substrat chromogène sur lequel on dépose une colonie bactérienne : en présence de bêtalactamase, il se forme un produit coloré rouge [104].



[Figure 15 : détection de b lactamase par le test céfinase](#)

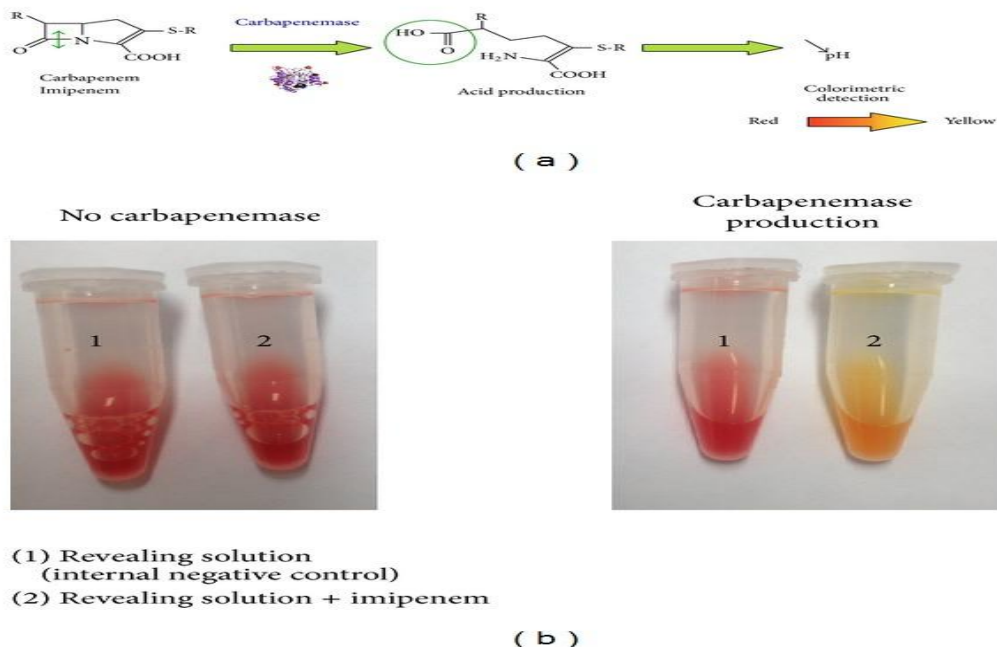
[\[http://www.microbes-edu.org/mecanisme/bla/generalites.htm\]](http://www.microbes-edu.org/mecanisme/bla/generalites.htm)

Ø Technique acidimétrique :

L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (de base des  $\beta$ -lactamines retrouvée dans tous les sous-groupes). La première étape de la réaction enzymatique variera en fonction du substrat (affinité) tels pénicilline G, oxacilline, ampicilline, carbénicilline, pipéracilline, céfalotine, céfuroxime, céfotaxime, imipénème, ...

Cette étape de formation d'un complexe enzyme-substrat sera fonction des constantes cinétiques de l'enzyme étudiée telles affinité appréciée par le  $K_m$  ou  $K_i$ , ou encore vitesse d'hydrolyse exprimée, le plus souvent, en  $V_{max}$ . Le produit de la réaction aboutit à la formation de composés acides tels l'acide pénicilloïque ou céphalosporoïque.

La détection de carbapénémase par technique de Nordman entre dans ce cadre : [105]



[Figure16 : Le principe \(a\) et l'interprétation \(b\) du test de Carba NP récemment mis au point pour l'identification rapide des producteurs de carbapénémases chez Enterobacteriaceae et Pseudomonas spp.](https://www.researchgate.net/figure/262022168_fig5_Principle-a-and-interpretation-b-of-the-Carba-NP-test-recently-developed-for-the-Enterobacteriaceae-et-Pseudomonas-spp.)

[[https://www.researchgate.net/figure/262022168\\_fig5\\_Principle-a-and-interpretation-b-of-the-Carba-NP-test-recently-developed-for-the-Enterobacteriaceae-et-Pseudomonas-spp.](https://www.researchgate.net/figure/262022168_fig5_Principle-a-and-interpretation-b-of-the-Carba-NP-test-recently-developed-for-the-Enterobacteriaceae-et-Pseudomonas-spp.)]

### ü Recherche de BLSE :

Les BLSE sont des enzymes produites par certaines bactéries les rendant résistantes à de nombreux antibiotiques incluant les C3G et aztréonam. Ces enzymes agissent en hydrolysant le cycle  $\beta$ -lactame, support de l'activité des  $\beta$ -lactamines (BLA). Le gène codant est présent au niveau du chromosome de bactéries particulières et transféré à d'autres populations bactériennes par l'intermédiaire de plasmides. Nombreuses Entérobactéries productrices de BLSE (EB-BLSE) sont connues aujourd'hui, dont *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. Les premières infections à EB-BLSE sont rapportées chez *K. Pneumonia* en Allemagne en 1983 et ont diffusé à toute l'Europe ainsi qu'en Amérique. En Asie, les premières infections ont été notées en Chine en 1988 [106] [107] [108].

Les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80 en France, puis en Allemagne. Elles sont induites soit par des plasmides (fréquents), soit par la mutation du génome naturel chez *Klebsiella spp*, codant pour une bêtalactamase SHV. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de bêtalactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactams (aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (imipénème) et elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam,

inhibiteurs classiques de bêta-lactamases. La présence de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux fluoroquinolones [109].

Au sein des bacilles à Gram négatif, de nombreuses enzymes à médiation plasmidique, ou de manière plus précise des gènes cassette situés dans un intégron comportant une CR (common region), ont été identifiées grâce à l'approche moléculaire. Parmi les BLSE médiatrices de la résistance vis-à-vis des C3G, il convient de citer le groupe CTX-M puis les bêta-lactamases de type BES, GES, PLA, PER, VEB. La résistance vis-à-vis des C3G, des céphamycines et des associations comportant un inhibiteur enzymatique de type acide clavulanique, liée à la synthèse de diverses céphalosporinases devenues transférables (ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY, DHA, FOX, MIR-1, MOX-1) a vu son domaine s'élargir : distribution géographique et diversité des bactéries productrices. La résistance vis-à-vis des carbapénèmes, jusque-là peu fréquente, a vu exploser le nombre de bêta-lactamases impliquées avec les types IMP, VIM, SME, GIM, KPC, OXA. Préférentiellement observée à l'origine chez *Pseudomonas aeruginosa* (types IMP, VIM), ces enzymes sont maintenant plus fréquentes chez les entérobactéries [110].

La technique la plus communément admise est la technique de synergie par diffusion. C'est la mise en évidence de la synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines (C3G), en disposant à la surface d'une gélose des disques de C3G et d'amoxicilline + acide clavulanique à 3 cm l'un de l'autre. Après une nuit d'incubation, une image de synergie d'action entre les deux antibiotiques dite en bouchon de champagne indique la présence de BLSE.



[Figure 17 : Test de détection de BLSE par synergie C3G ou aztréonam et inhibiteur de bêta-lactamases \(acide clavulanique, sulbactam, tazobactam\)](#)

[Tirée de : [www.microbes-edu.org/mecanisme/phenoR/blse/detection.html](http://www.microbes-edu.org/mecanisme/phenoR/blse/detection.html)]

Une technique variante est de comparer l'action de céfotaxime et céftazidimes seules et en présence d'acide clavulanique, sur gélose (diamètres différents, plus grands en présence d'acide clavulanique ou activité plus franche dans les cupules contenant C3G+Clavulanate.). Une dernière variante utilise les bandelettes E-Test imprégnées d'un gradient de concentration de C3G à un bout et de cette même C3G associée à l'acide clavulanique. Après une nuit d'incubation, l'ellipse d'inhibition plus grande du côté du clavulanate indique la présence de BLSE. (Voir image suivante)

Different growth-inhibition patterns:



Figure 4. Clear cut ESBL positive:  
MIC CT/CTL = 1.5/0.047 = 32

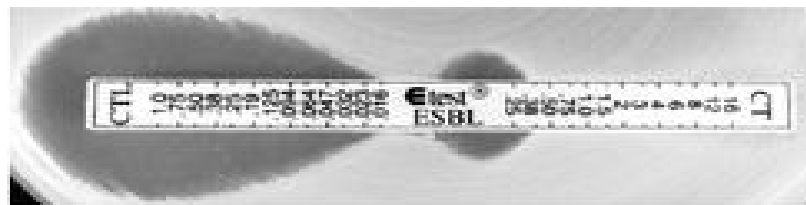


Figure 5. A "rounded" phantom inhibition zone below CT indicative of ESBL.

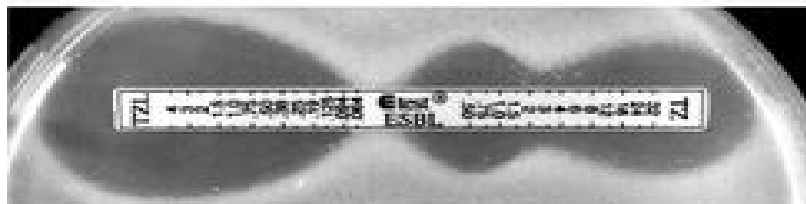


Figure 6. Deformation of the TZ inhibition ellipse indicative of ESBL.

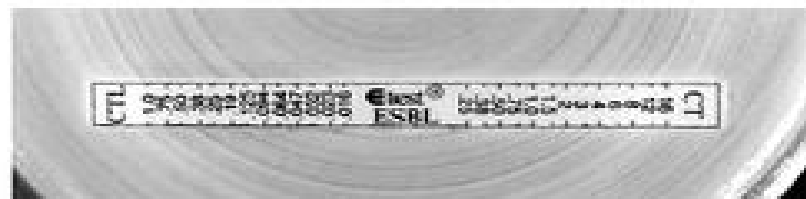


Figure 7. When MIC values are above the test ranges, result is Non-Determinable (ND).

[Figure 18 : Bandelette E-Test dans la détection des BLSE](#)

[<http://www.biomerieuxindia.in/product/etest-antimicrobial-resistance-detection-ard>]

Le recours aux milieux chromogènes a lieu lors de dépistage des BMR chez des malades hospitalisés à risque ou lors d'épidémie à bactérie hautement résistante (BHR), dans le but de lutter contre les infections acquises lors de l'hospitalisation

[111].



[Figure 19 : Gélose chromogène ChromID BLSE de BioMérieux™.](#)

La détection phénotypique des BLSE chez les bactéries autre que *E. coli*, *Klebsiella spp* et *Proteus spp* reste une problématique et un sujet controversé [112] [113]. En effet, la présence de BLSE est souvent masquée par d'autres types de  $\beta$ lactamases qui ne sont pas inhibés par l'acide clavulanique, tels que les enzymes de type AmpC  $\beta$ lactamases de classe C) produites essentiellement par *Enterobacter spp* et par *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs méthodes ont été décrites sur milieu additionné de cloxacilline pour inactiver les céphalosporinases ou sur milieu additionné d'EDTA pour inactiver les métallo-bêta-lactamases [114].

Pratiquement tous les germes Gram négatif possèdent un gène chromosomique *AmpC* qui code pour une céphalosporinase AmpC, en général de faible expression et sans hydrolyser efficacement les céphalosporines. Mais les *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter* produisent des céphalosporinases inductibles,

pas faciles à détecter au laboratoire. Sous traitement aux céphalosporines, ces germes peuvent donc développer une résistance (inductible) à toutes les céphalosporines et elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Elles restent cependant sensibles aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération ; comme le céfépime ; et aux carbapénèmes. [109].

Cette AmpC gêne la visualisation d'une éventuelle BLSE. Ceci oblige à recourir à des artifices pour inhiber l'AmpC (cloxacilline incorporée à raison de 200µg/mL au milieu Mueller-Hinton) afin de laisser s'exprimer la BLSE seule ; ou bien par disques C3G sans et avec cloxacilline (méthode des disques combinés) [113]. (Figure 20)



[Figure 20 : Exacerbation des diamètres d'inhibition des disques C3G \(CAZ et CTX\) en présence de cloxacilline \(CLA\) chez \*E coli\* BLSE+ et AmpC haut niveau+. \[Thomson KS. Extended-Spectrum- \$\beta\$ -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. \*J. Clin. Microbiol.\* April 2010 vol. 48 no. 4, 1019-1025\]](#)

### Ø Le Cica-Beta-Test :

Le Cica-Beta-Test permet une détection rapide des BLSE (en 15 min) à partir d'une culture bactérienne de 24 h. Ce test utilise 4 bandelettes : une bandelette ne contenant aucun inhibiteur, une deuxième contenant l'acide clavulanique (détection des BLSE), une troisième contenant l'acide boronique (détection des enzymes de type AmpC) et une quatrième contenant l'EDTA (détection des métallo- $\beta$ -lactamases). Le test est basé sur l'utilisation d'une céphalosporine chromogène, HMRZ-86, possédant un groupement protecteur qui prévient la rupture de son cycle  $\beta$ -lactame. Cependant, cette céphalosporine est hydrolysée par les BLSE, les enzymes de type AmpC et les métallo- $\beta$ -lactamases en donnant un changement de coloration du jaune au rouge après 2 à 15 min à température ambiante. Si la bactérie possède une BLSE, seule la bandelette concernée doit rester jaune puisque l'acide clavulanique l'aura neutralisée. Par contre, si toutes les bandelettes virent au rouge, il est alors impossible de préciser la nature de la multirésistance au moyen de ce simple test. La sensibilité de cette technique a été estimée à 85 % pour la détection des BLSE [115].

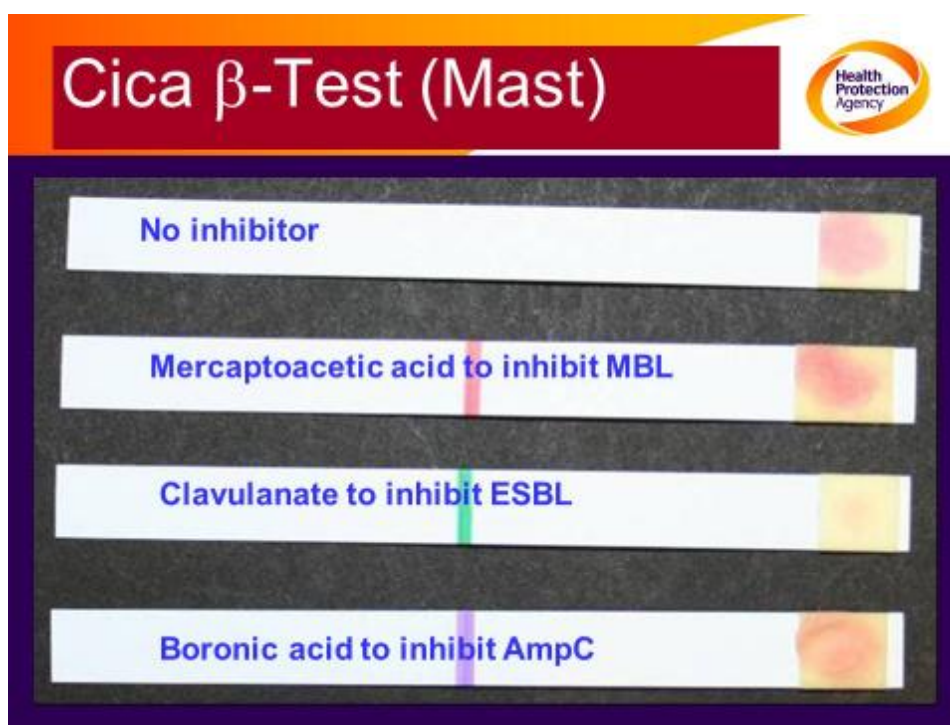


Figure 21 : Bandelettes du Cica bêta Test.

[Source : <http://slideplayer.com/slide/2543298/>]

### ü Recherche de méticillino-résistance chez les staphylocoques :

Plusieurs méthodes de détection de la résistance à la méticilline ont été utilisées pour détecter les *S. aureus* résistants à la méticilline. La micro-dilution en bouillon est la méthodologie standard (ISO 20776-1). Quand la CMI de céfoxitine > 4 mg / L, les souches testées doivent être rapportées comme résistantes à la méticilline. Les méthodes utilisées sont : la diffusion en gélose avec les disques d'oxacilline à 5 µg ou bien des disques de céfoxitine à 30 µg sur Mueller-Hinton (MH) avec ou sans NaCl (2 %) et incubation à 37 ou 30 °C pendant 24 et 48 heures respectivement, la détermination de la CMI de l'oxacilline par E-test sur MH avec et sans NaCl, la recherche de la PLP2a par *Slidex MRSA Detection*<sup>®</sup> après induction avec un disque de céfoxitine et la détection du gène *mecA* par amplification génique. La détection de la résistance des souches SA-SARM avec l'oxacilline est plus sensible (100 %) sur MH hypersalé que MH incubé à 30°C pendant 48 heures (97,3 %). Quelles que soit les conditions de culture, la céfoxitine détecte la résistance à la méticilline. Les souches ayant une CMI de l'oxacilline de 2 à 128 mg/l possèdent le gène *mecA* et la PLP2a [116].

La détection ancienne de Staphylocoques méti-R se faisait par un disque d'oxacilline chargé à 5µg sur gélose Mueller-Hinton (MH) normotonique à 30°C ou sur milieu MH hypersalé (6.5%NaCl) à 37°C. L'incubation doit être prolongée à 48 h si la croissance apparaît faible après 24h. Cela obligeait le biologiste à tester ce disque seul sur une boîte de Pétri, donc loin des autres disques. En plus, il s'est avéré d'après les CMI mesurées des souches catégorisées S et celle catégorisées R qu'il y avait une large zone grise (chevauchement important des courbes des CMI). En effet, l'expression hétérogène de la résistance affecte particulièrement les CMI de l'oxacilline, qui peut apparaître active (S) [117].

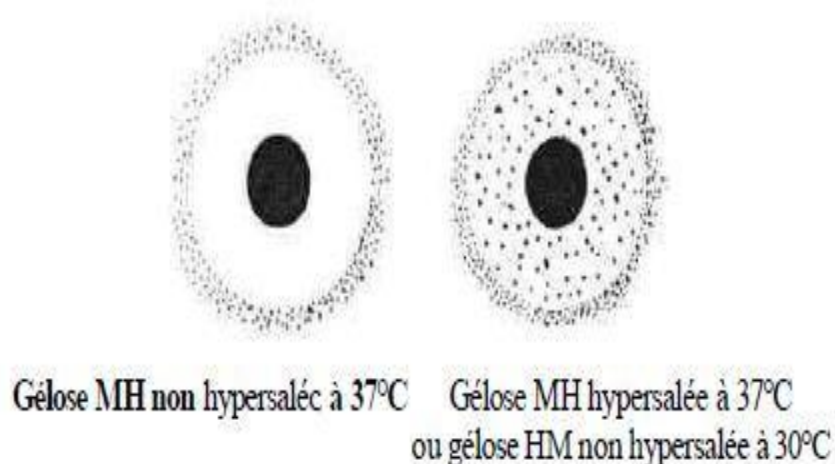


Figure22 : résistance hétérogène à la méticilline

[Tirée de <http://www.medical-actu.com/cours/bacteriologie/staphylocoques/>]

Il existe des souches résistantes homogènes à haut niveau à la méticilline. Leur détection par antibiogramme ne pose pas de problème.

Plus souvent la résistance est hétérogène et seule une faible fraction des bactéries est capable d'exprimer sa résistance dans des conditions standards de culture. Pour favoriser l'expression de cette résistance à la méticilline sur antibiogramme il est nécessaire de placer un disque de méticilline (ou d'oxacilline qui est plus stable) :

- soit sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton incubée entre 25 et 30°C et observée après 24 et 48 heures.
- soit sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton hypersalée (5 % de NaCl) et incubée à 37°C.

Dans ces conditions, la résistance hétérogène se traduit par la présence de petites colonies dans la zone d'inhibition autour du disque. Ces colonies sont mieux visibles après une incubation de 48 heures.

Actuellement, la céfoxitine et le moxalactam ont prouvé leur supériorité (plus sensibles et plus spécifiques) par rapport à l'oxacilline. Ces deux molécules s'utilisent à 37°C en milieu MH normal avec tous les autres antibiotiques. Elles permettent en plus de bien distinguer les Staphylocoques méti-R des Méti-S (absence de zone grise) [118].

L'expression hétérogène de la résistance affecte particulièrement les CMI de l'oxacilline, qui peut apparaître active (S). La céfoxitine est un marqueur très sensible et spécifique de la résistance à la méticilline médiée par *mecA* / *mecC*, y compris dans les souches exprimant des résistances hétérogènes, et est le disque de choix. La diffusion par disque à l'aide de l'oxacilline est déconseillée et les diamètres des zones d'interprétation ne sont plus inclus dans le tableau de décision de l'EUCAST en raison d'une faible corrélation avec la présence du gène *mecA* [119].

La micro-dilution en bouillon est la méthodologie standard (ISO 20776-1). Quand la CMI de céfoxitine > 4 mg / L, les souches testées doivent être rapportées comme résistantes à la méthicilline.

La diffusion de disque est la méthode la plus simple et la plus directe. Les souches ayant un diamètre de zone de céfoxitine (disque de 30 µg) <22 mm doivent être déclarées résistantes à la méthicilline.

La détection par des méthodes d'agglutination au latex sont également recommandées. La détection de la protéine PBP2a avec des kits d'agglutination au latex est possible en utilisant des tests commerciaux ou internes, sachant que la PBP2c n'est pas détectée par la majorité des tests commerciaux [111] [120] [121].

### ü Détection de la résistance bactérienne aux carbapénèmes :

Les gènes codant pour les carbapénémases les plus répandues sont le plus souvent localisés sur des plasmides pouvant être transférés de souches à souches, mais aussi entre 2 espèces proches. C'est pourquoi il est essentiel d'identifier les souches hébergeant ce type de mécanismes transférables en raison du danger potentiel qu'elles représentent en tant que sources, réservoirs, et véhicules de gènes de carbapénémases. Il est ainsi possible d'observer chez certains patients des souches appartenant à des espèces d'entérobactéries différentes et produisant la même carbapénémase, probablement en raison d'un transfert de plasmides entre les deux espèces dans le tube digestif de l'hôte. [126]

Identification des EPC à partir de prélèvements cliniques: patients infectés

Les entérobactéries les plus fréquemment concernées sont *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*. En revanche, *Proteus* sp. Et *Morganella morganii* sont naturellement moins sensibles à l'imipénème et la présence de carbapénémases est rare dans ces espèces.

La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC.

Ainsi toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème (CMI  $\geq 0,5$  mg/L ou une diamètre d'inhibition  $< 28$  mm; disques de 10  $\mu$ g) par test de diffusion en gélose est à considérer comme suspecte d'être une EPC. En outre, dans certains cas, la sensibilité de détection de la production de carbapénémase peut être améliorée par l'utilisation d'au moins 2 carbapénèmes différents (ex : imipénème ET ertapénème) [121].

### ✚ Méthodes classiques:

Ces tests phénotypiques sont basés sur les propriétés inhibitrices de l'acide boronique vis-à-vis des carbapénèmases de type KPC, de l'acide dipicolinique ou de l'EDTA vis-à-vis des métallo-lactamases et de la cloxacilline vis-à-vis des céphalosporinases (AmpC) [127]. Afin de pouvoir détecter également les carbapénèmases de type OXA-48, un disque contenant de la témocilline est présente dans certain kits commerciaux. En effet, la grande majorité des souches produisant une carbapénémase de type OXA-48 (98.2%) sont très résistantes à la témocilline (diamètre d'inhibition inférieur à 12 mm pour des disque chargé à 30 ug) [128] La résistance à la témocilline possède une bonne valeur prédictive positive pour les EPC de types OXA-48, cependant certaines espèces sont naturellement résistance à cet antibiotique (ex. *H. alvei*) et d'autres mécanismes (assez rares) peuvent induire une résistance à la témocilline.

#### *Avantage :*

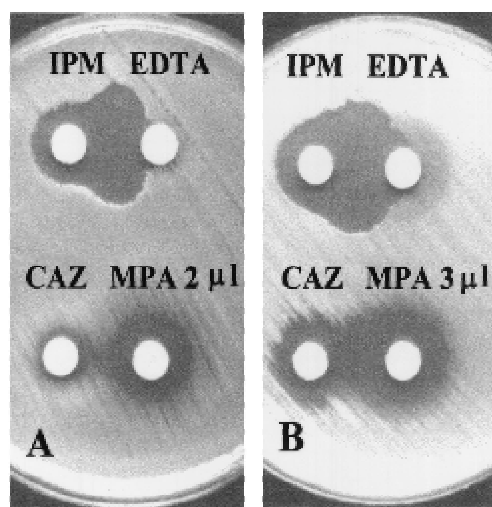
- Kits commerciaux (ex : KPC, MBL & OXA-48 confirm kit, ROSCO, ref. # 98015)

#### *Inconvénients :*

- ✓ Quelques faux positifs : essentiellement *Enterobacter* spp. surexprimant leur céphalosporinase naturelle qui peut être inhibée par l'acide boronique
- ✓ Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC possédant de bas niveaux de résistance au méropénème
- ✓ Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC produisant plusieurs carbapénèmases de différent types (ex : NDM + OXA-48-like, KPC + VIM, ces souches sont encore assez rares en France)
- ✓ Nécessite un délai additionnel de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec l'identification rapide de carbapénèmases [105]

## Le Test de Hodge modifié

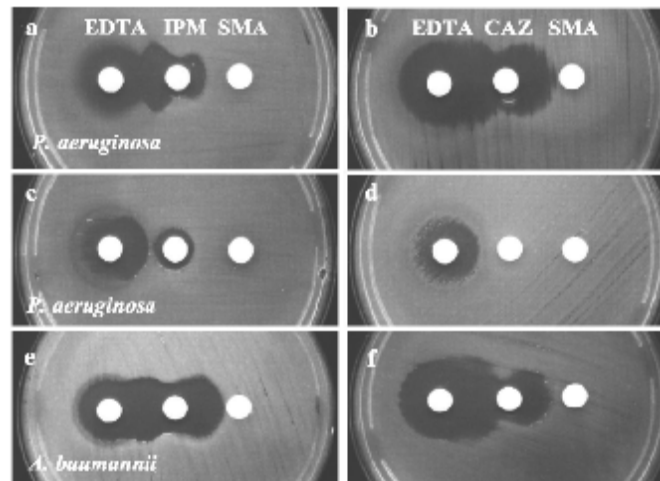
Le test a été défini par Lee et al chez *Acinetobacter* et *Pseudomonas aeruginosa* [129]



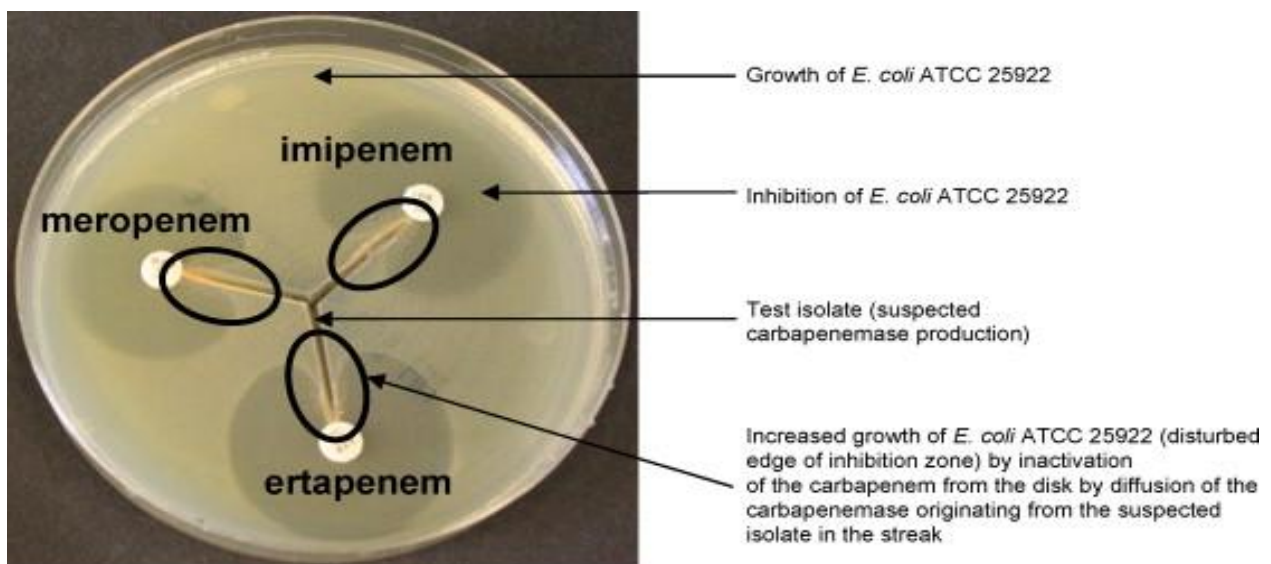
[Figure 23 : Performances des DDST utilisant des disques d'IPM ou de CAZ et des disques d'EDTA \(1.900 µg\) ou d'AMP.](#)

Les panneaux A et B montrent les résultats pour deux isolats différents de *P. aeruginosa*. Un disque IPM et un disque EDTA ont produit de grandes zones d'inhibition synergique pour les deux isolats (A, haut et B, haut). Un disque CAZ et un disque MPA 2 n'ont pas réussi à produire une zone synergique (A, en bas), mais un disque CAZ et un disque MPA 3 ont produit une petite zone synergique (B, en bas) [114].

Les DDSTs à base de disques IMP-EDTA, CAZ-MPA ou CAZ-SMA (sodium mercapto-acetic acid) ont à la fois des points forts et des points faibles pour la détection des *Pseudomonas* et des *Acinetobacter* producteurs de MBL. L'utilisation d'un disque IPM et d'un EDTA (750µg) ou un disque SMA (2 mg) améliore la performance du test, permet de tester les isolats non sensibles à l'imipénème et réduit la durée du travail de dépistage (image ci-dessous) [130].



Le Hodge-test modifié actuel permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre souches productrices de carbapénémases (souche à tester déposée en strie sur une culture en nappe de souche sauvage de référence sensible d'*Escherichia coli*). Le disque d'ertapénème est réputé le plus sensible quand il s'agit d'Entérobactéries. En revanche, quand il s'agit de *Pseudomonas* ou bien d'*Acinetobacter*, l'emploi de l'imipénème et/ou du méropénème [131].



Example of positive modified Hodge test (photo Neil Woodford, Health Protection Agency, England)  
 [Image d'après StuartJC, Maurine A. Van Hall L. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010 ; Volume 36, Issue 3 : 205-210]

*P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* producteur de carbapénémases sont communs dans de nombreuses régions d'Europe [132]. Chez *P. aeruginosa*, le type VIM, principalement le VIM-2, est l'enzyme dominante en Europe, mais des producteurs de KPC ont également été observés dans les pays d'Amérique latine. Chez *Acinetobacter*, les carbapénémases OXA, principalement les enzymes de type OXA-23-, OXA 24 / 40-, OXA-58-, OXA-143-, OXA-235, se rencontrent le plus souvent [133].

Il n'existe actuellement aucun inhibiteur spécifique des OXA-carbapénémases de classe D et aucune des méthodes phénotypiques existantes ne donne des résultats satisfaisants pour la détection / identification de ces carbapénémases chez *Acinetobacter*. Des essais de tests colorimétriques ont été essayés, mais n'ont pas prouvé dans l'ensemble dans ce genre. *Acinetobacter* peut également avoir des carbapénémases de type MBL ; et il est possible que les tests puissent mieux fonctionner avec ces enzymes [134].

*Avantages du test :*

- Peu coûteux
- Bonne détection des souches productrices de carbapénémases de type OXA-48 et EPC (1ère et 3ème carbapénémase en France en 2013 respectivement)

*Inconvénients :*

- Faux négatifs : essentiellement souches produisant une carbapénémase de type NDM, 2nd carbapénémase en France en 2013.
- Nombreux faux positifs : essentiellement *Enterobacter* spp. surexprimant leur céphalosporinase naturelle.
- Nécessite un délai de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec une identification rapide des carbapénémases.

### Tests chimiques ou physicochimiques :

Deux techniques, répondant bien aux besoins actuels, ont été mises au point récemment.

-La première correspond à la recherche d'une modification du spectre d'un carbapénème sous l'effet d'une carbapénémase. Il s'agit d'une application de la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

Cette technique nécessite une mise au point fine, du personnel particulièrement entraîné et un spectromètre de masse (système ouvert). elle est basée sur la détection par spectrométrie de masse, après mise en contact pendant quelques heures (en général 2-3h) de la souche à tester avec une solution de carbapénème, de la disparition du pic correspondant au carbapénème testé et de l'apparition d'un pic correspondant au(x) produit(s) d'hydrolyse de ce même carbapénème [137] [138].

### Spéctrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique analytique dans laquelle les composés chimiques sont ionisés en molécules chargées puis accélérées dans un cyclotron et enfin détectées sous forme de bâtonnets ou pics correspondant à la taille de chaque fragment. Le spectre obtenu, dit spectre de masse, est spécifique à chaque molécule analysée. La source d'ions est inventée par Dempster (ESI) puis perfectionnée quelques années plus tard par Bleakney (1928). D'autres sources d'ionisation utilisées pour la spectrométrie de masse sont la chaleur, une source chimique, ... et enfin, un laser, rayonnement ultra pur et puissant, d'où est née la MALDI-TOF SM. Le concept de Time Of Flight (TOF) a été proposé par William E. Stephens. Dans un analyseur TOF, les ions sont séparés par des différences de vitesses. Le TOF/MS est rapide. Il est applicable à la détection chromatographique, et il a maintenant beaucoup évolué et est utilisé dans plusieurs domaines. Les deux

techniques (ESI et MALDI) sont basés sur des méthodes d'"ionisation douce" dans lesquelles la formation d'ions ne conduit pas à une perte significative de l'intégrité de l'échantillon. La technique MALDI-TOF MS a certains avantages par rapport à l'ESI-MS ; à savoir : i) MALDI-TOF MS produit des ions à charge unique, donc l'interprétation des données est facile comparée à ESI-MS ; ii) une séparation préalable par chromatographie est nécessaire pour l'analyse par ESI-MS [162]. Par conséquent, le débit et la vitesse élevés associés à une automatisation nécessaire complète ont fait du spectromètre de masse MALDI-TOF un choix évident à grande échelle [163].

#### Ø Le MALDI-TOF: principe et méthode :

Le spectromètre de masse MALDI-TOF permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans se dégrader. La méthode s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides et les antibiotiques [135].

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre [136].

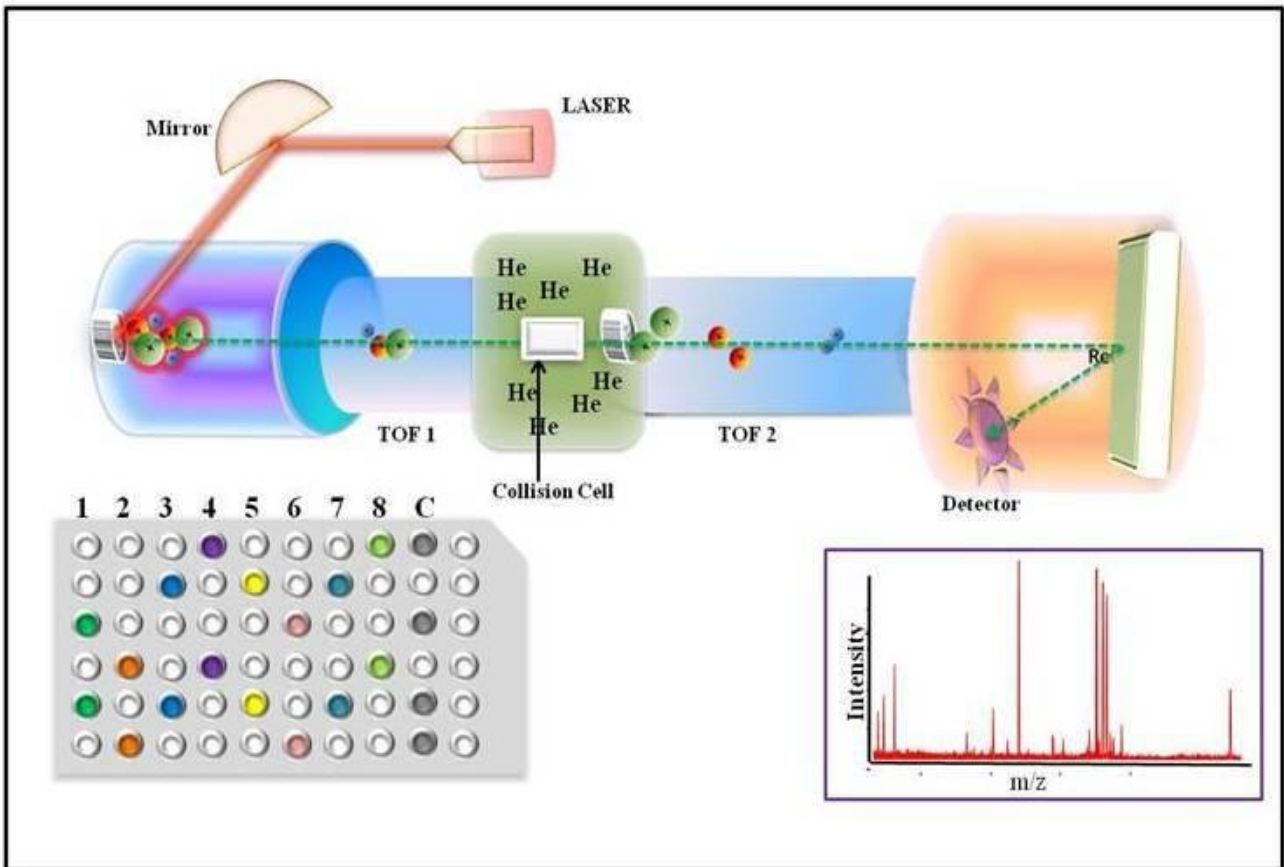


Figure24 : flux de travail au cours de MALDI-TOF

[Tirée de Virtual Labs <http://pe-iitb.vlabs.ac.in/index.html>]

Bien que les conditions de culture puissent affecter profondément la physiologie microbienne et le profil d'expression des protéines [164]. Elles n'influencent pas l'identification microbienne par MALDI-TOF MS. [140] [165] ces auteurs ont cultivé trois espèces bactériennes sur quatre milieux de culture différents et ont découvert que l'identification microbienne MALDI-TOF MS était indépendante des conditions de culture. Un autre groupe de recherche [141] [166] a également rapporté que les conditions de culture et le temps de culture n'ont pas affecté l'identification microbienne par MALDI-TOF MS, de souches cliniques de staphylocoques impliqués dans les infections humaines.

Dans le domaine de la détection de résistance bactérienne, Il a été montré que MALDI-TOF MS génère des empreintes de masse capables de discriminer les lignées

de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline [167]. Dans des conditions expérimentales prudentes, il s'est également avéré utile pour sous-typé les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline [143] [168].

De même, il a été démontré que la SM MALDI-TOF est très utile pour identifier les entérocoques résistants à la vancomycine [169] [170] Wang et al. (2014) [171] ont suggéré que la SM MALDI-TOF pourrait être utilisée comme outil de dépistage pour distinguer les souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine des souches d'*E. Faecium* sensibles à la vancomycine.

La production de  $\beta$ -lactamases est détectée par MALDI-TOF MS en utilisant un test de spectrométrie de masse  $\beta$ -lactamase (MSBL). Dans cet essai, une solution tamponnée de l'antibiotique est mélangée à une culture bactérienne et incubée. Le mélange réactionnel est centrifugé et le surnageant est soumis à une analyse MALDI-TOF MS. Les producteurs de  $\beta$ -lactamases inactivent le cycle  $\beta$ -lactame de l'antibiotique en ajoutant un résidu d'eau. Le déplacement de masse dans les formes non hydrolysées et hydrolysées de l'antibiotique confirme la présence ou l'absence de bactéries productrices de  $\beta$ -lactamase. Le test MSBL a été utilisé pour détecter la résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines tels que la pénicilline, l'ampicilline, la pipéracilline, la cétazidime, la céfotaxime, l'ertapénème, le méropénème et l'imipénème. En utilisant des tests MSBL, des chercheurs ont détecté avec succès des organismes producteurs de  $\beta$ -lactamase comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* spp. etc [172] [173] [174] [175].

### Preparation scheme for the detection of $\beta$ -lactamase activity

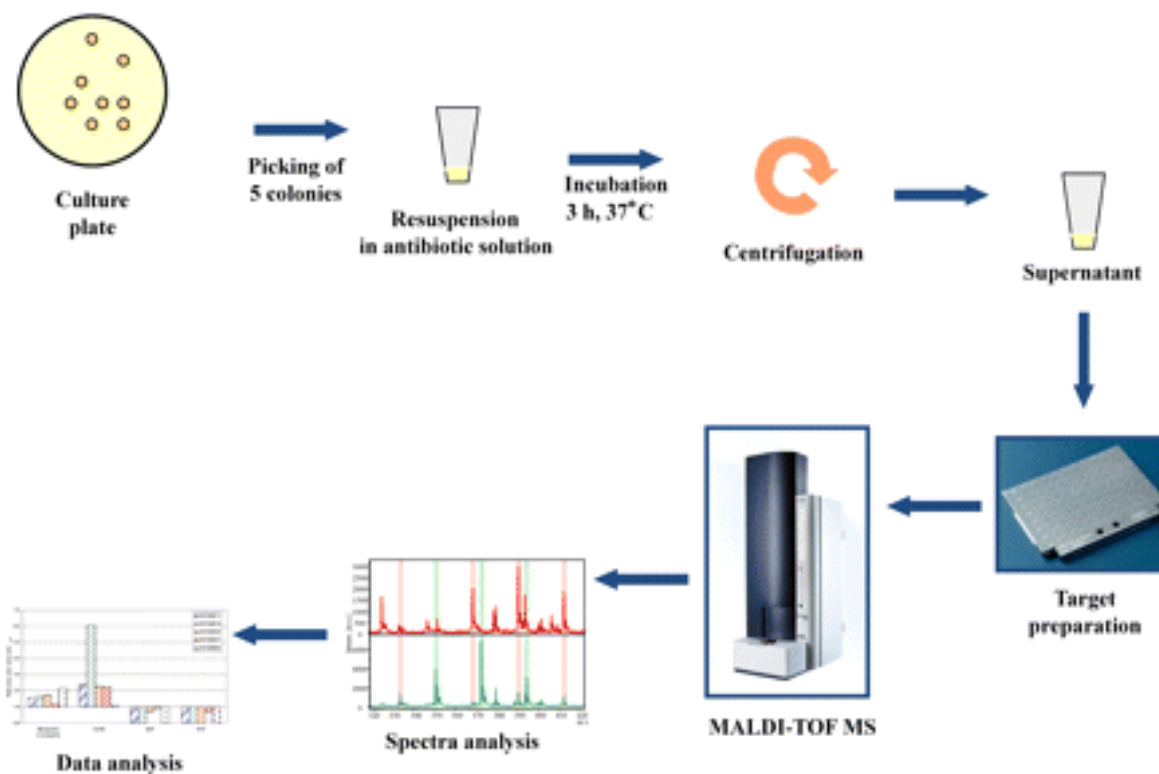


Figure 25 : [procédure de détection des métabolites de beta lactamase par la spectrométrie de masse MALDI-TOF](#)

[Ledeboer NA, Hodinka RL. Molecular Detection of Resistance Determinants. *J. Clin. Microbiol. September 2011 vol. 49, no. 9 Supplement : S20-S24*]

Compte tenu de la précision de la détection de résistance avec les MSBL, d'autres innovations et améliorations en termes d'amélioration de la vitesse de détection de la résistance et d'extension de détection de résistance aux nouvelles classes d'antibiotiques  $\beta$ -lactamines dans les dosages MSBL sont envisagées. Récemment, Johansson et al. (2014) [176] ont développé une méthode MALDI-TOF MS pour la détection et la vérification de la production de carbapénémases dans une bactérie anaérobie, *Bacteroides fragilis*, dès 2,5 h. Hoyos-Mallecot et al. (2014)[177] ont évalué une méthode MALDI-TOF MS pour l'identification et la différenciation de souches cliniques productrices de carbapénémases d'Enterobacteriaceae et de *P. aeruginosa* à partir de souches productrices de métallo- $\beta$ -lactamases. Hart et al. (2015)[153] ont rapporté une stratégie modifiée pour la détection de biomarqueurs de résistance aux antibiotiques dans des souches cliniques d'*E. coli* en utilisant MALDI-TOF MS. Ils ont suggéré qu'au lieu d'utiliser des cellules bactériennes intactes pour la spectrométrie, le compartiment périplasmique devrait être extrait (puisque les  $\beta$ -lactamases sont situées dans le périplasme); en solution digérée par la trypsine, séparée par nano-LC avant l'analyse MALDI-TOF MS. En utilisant cette approche, ils ont rapporté la séquence peptidique de biomarqueurs pour plusieurs classes de  $\beta$ -lactamases comme la  $\beta$ -lactamase à spectre étendu du groupe CTX-M-1, la  $\beta$ -lactamase TEM, la VIM a métallo- $\beta$ -lactamase et la CMY-2 et l'ampC  $\beta$ -lactamase. En outre, en utilisant cette approche, ils ont également détecté les peptides spécifiques d'une enzyme de modification des aminoglycosides, Kan-R [178].

De même que pour les  $\beta$ -lactames, la résistance des aminosides aux microorganismes est principalement due à la modification enzymatique des antibiotiques par les acyltransférases bactériennes, les adényltransférases et les phosphotransférases. Puisque ces enzymes présentent une préférence différente

pour le substrat CoA présent dans différents aminoglycosides, il n'a pas été possible d'établir un dosage universel basé sur spectrométrie de masse pour la détection de la résistance aux aminoglycosides. Des efforts supplémentaires pour développer et standardiser la SM MALDI-TOF pour la détection de la résistance aux aminoglycosides dans les laboratoires de routine sont toujours en cours [179].

-La seconde technique de diagnostic rapide est le Carba NP test (Carba Nordmann-Poirel test). Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase.

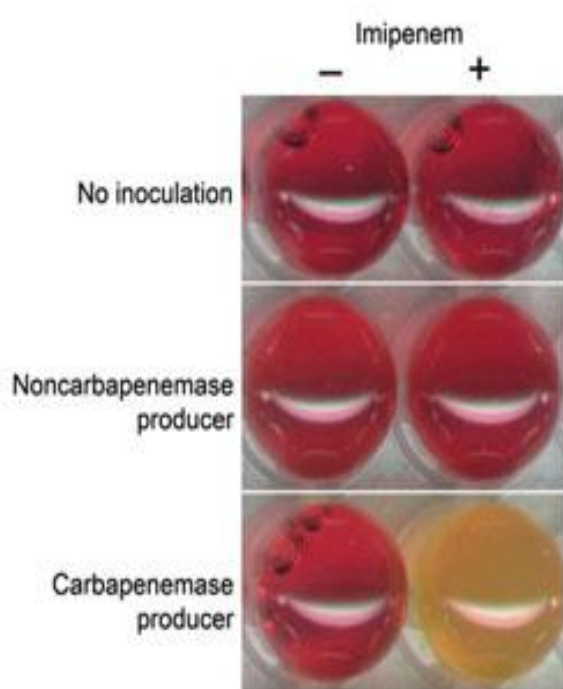


Figure 1. Representative results of the Carba NP test. The Carba NP test was performed with a noncarbapenemase producer (*Escherichia coli* producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, upper panel) and with a carbapenemase producer (*Klebsiella pneumoniae*-producing New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1, lower panel) in a reaction medium without (left panel) and with (right panel) imipenem. Uninoculated wells are shown as controls. Photographs were taken after a 1.5-hour incubation. A color version of this figure is available online ([wwwnc.cdc.gov/EID/article/18/9/12-0355-F1.htm](http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/18/9/12-0355-F1.htm)).

[Figure 26: Principe du test Carba NP](#)

[Nordmann P, Poirel, L, Dortet, L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 2012 ;18(9), 1503-1507.

<https://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120355>]

L'indicateur de pH change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénèmase. Ce test a été largement évalué au sein du CNR (> 4000 souches d'entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes). Il possède une excellente spécificité et une excellente sensibilité [139] [140] [141].

*Avantage :*

- Peu coûteux
- Peut être réalisé sur les souches isolées voir directement à partir des hémocultures positives
- Facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire (nécessite peu de moyens : matériels et réactifs)
- Sensible et spécifique (100%)
- Rapide (< 2h) sur souches isolées
- Excellente sensibilité et spécificité de détection de toutes les carbapénèmases

*Inconvénient :*

- nécessité de mettre au point la technique au laboratoire.

A-1-3-c-lecture interprétative de l'antibiogramme :

L'interprétation phénotypique est devenue possible puis incontournable grâce aux progrès considérables de la connaissance des mécanismes biochimiques de la résistance des bactéries et des déterminismes génétiques impliqués [122] [114] [121].

À titre d'exemple, la découverte de très nombreuses enzymes d'inactivation, mécanisme principal de la résistance aux antibiotiques. La résolution de leur structure et leur purification a permis d'en établir avec précision leur « spectre de substrat ». Il s'agit du panel d'antibiotiques que ces enzymes sont capables d'hydrolyser *in vitro*, plus ou moins fortement, selon la sensibilité de la molécule à l'enzyme. Dès lors, leur détection chez une bactérie pathogène se fera grâce à l'utilisation dans l'antibiogramme de la molécule la plus sensible du panel (marqueur de résistance : exemple de l'utilisation de la kanamycine pour tester la sensibilité de *Staphylococcus sp* à l'amikacine ou bien le nalidixate chez *Haemophilus sp* pour dépister la résistance aux fluoroquinolones). Leur mode de production, constitutive ou inductible, a permis de mettre au point des tests de facilitation de détection par le placement judicieux des disques d'antibiotiques sur la gélose (inhibiteurs de bêta-lactamases et céphalosporines de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération (C3G ou C4G), érythromycine-clindamycine,...) [122][123] [124].

L'interprétation phénotypique ou lecture interprétative de l'antibiogramme se fait habituellement en trois étapes.

1. Pour chaque famille d'antibiotiques, on observe le résultat brut *in vitro* obtenu pour un certain nombre de molécules judicieusement choisies, dont les marqueurs (il n'est bien sûr pas possible de tester toutes les bêta-lactamines par exemple). On obtient ainsi un phénotype de résistance, « observé ».

2. De ce phénotype de résistance, on déduit un mécanisme biochimique de résistance (attention aux associations de mécanismes dont sont capables les bactéries et qui compliquent parfois singulièrement cette étape) ainsi que son déterminisme génétique.

3. Une fois le mécanisme élucidé, on en déduit toutes les résistances croisées pour établir le panel de l'ensemble des molécules concernées par le mécanisme de résistance incriminé.

On mesure là toute l'importance de la lecture interprétative. Elle permet également d'envisager les résistances associées qui peuvent être plus difficiles à détecter (ex : méticilline résistance et résistance aux fluoroquinolones pour le staphylocoque). Cette interprétation phénotypique suppose, bien sûr, de bien connaître les résistances naturelles [125].

Souvent réalisée par le biologiste lui-même pour les antibiogrammes par diffusion, elle est, dans de nombreux automates de détermination de la sensibilité, le résultat d'un système dit « expert » Ceux-ci mesurent en général des CMI par micro-dilution en milieu liquide et les comparent à la concentration critique de l'antibiotique en question.

Ce contrôle de validation vise à :

- Vérifier la cohérence germe/antibiogramme
- Détecter les phénotypes de résistance impossibles
- Détecter l'absence d'une résistance associée
- A reconnaître des phénotypes anormaux pouvant correspondre à de nouvelles modalités de résistance.
- A lancer l'alerte de présence de bactéries multirésistantes nosocomiales.

A-1-3-d-Compte rendu d'analyse :

En complément du tableau de lecture interprétative, le microbiologiste doit joindre un commentaire qui précise au clinicien les points suivants :

=>Les résultats obtenus confirment l'identification biochimique, antigénique,..., de la bactérie considérée.

=>L'absence de résistance acquise pour la souche isolée dans le cadre des seuls antibiotiques testés (nécessité de se référer au profil de résistance naturelle);

=>En cas de résistance acquise, préciser la ou les classe(s) d'antibiotique(s) concerné(s) et si possible la nature du mécanisme de résistance acquis par la souche isolée du patient.

=>Proposer le cas échéant: une détermination précise de CMI pour un (des) antibiotique(s) testé(s); une recherche complémentaire de caractérisation du mécanisme de résistance acquis.

=>avertir le clinicien sur le caractère multi résistant de la souche afin de prendre les mesures d'hygiène qui s'imposent.

A-1-3-e- avenir de l'antibiogramme :

L'antibiogramme par diffusion reste incontournable dans la découverte de nouveaux mécanismes de résistance et dans la visualisation des interactions entre antibiotiques indispensables à l'interprétation phénotypique et est suffisant dans l'étude de la sensibilité des phénotypes sauvages. La mesure des CMI dans certaines situations critiques représente un complément décisif d'information à celles obtenues par l'antibiogramme réalisé par diffusion en milieu gélosé. Il importe cependant de connaître les limites et les incertitudes pesant sur chacune de ces deux approches, notamment, chaque fois qu'on est face à des bactéries exigeantes : *Neisseria, Haemophilus, ...*

Les CMI permettent d'affiner un choix thérapeutique en choisissant des molécules à plus faible CMI et qui sont tous interprétés « s ». Elles permettent également d'inclure les notions de sélection de résistance dans ce choix si on fait un choix contraire qui risque d'échouer. Elles autorisent en plus un suivi thérapeutique indispensable aux ajustements posologiques [125].

L'extension de la résistance bactérienne entretient un besoin permanent d'antibiogramme et son évolution. La réponse faite au clinicien pourrait évoluer vers une réponse plus globale et plus interprétée avec identification de la résistance qui permet de résumer l'ensemble des résultats en une combinaison de phénotypes facilitant les échanges d'information dans le but d'améliorer les corrélations *in vivo-in vitrosans* oublier le souci d'efficacité thérapeutique et d'efficience économique [99].

## IV- Détection de la résistance bactérienne par méthodes génotypiques :

### A-introduction :

En se basant sur les méthodes conventionnelles de culture bactérienne, les renseignements concernant la bactérie responsable et sa sensibilité aux antibiotiques, peuvent mettre plusieurs jours avant d'être disponibles. Dans la majorité des cas, ces tests de sensibilité phénotypiques sont suffisants et leurs performances progressent. À présent, des systèmes automatisés identifient la souche et fournissent un antibiogramme en quelques heures. Dans un proche avenir, des méthodes génétiques d'identification se basant sur l'analyse des séquences d'ADN pourront déterminer l'agent infectieux et ses résistances en moins d'une heure. Ces techniques dites de biologie moléculaire progressent et vont conduire au développement et à l'application de nouvelles stratégies perfectionnées pour l'analyse de la résistance bactérienne aux antibiotiques. En l'état actuel des connaissances, les deux méthodes d'information sur les résistances bactériennes, phénotypiques et génotypiques, sont complémentaires.

La détection des déterminants génétiques devrait permettre de contourner la nécessité d'isolement bactérien et d'éviter la dépendance vis-à-vis des conditions de culture. Par ailleurs, le risque lié à la culture de bactéries hautement virulentes s'en trouvera alors réduit. L'avantage est aussi d'obtenir plus facilement des résultats génotypiques sur des micro-organismes qui sont non cultivables, difficilement cultivables ou à croissance lente (Ex : *Mycobacterium tuberculosis*).

## B-Tests d'Amplification des Acides Nucléiques (TAAN) par Polymerase

### Chain Reaction (PCR) :

La PCR fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'amplification génique en utilisant de l'ADN polymérase. Il s'agit d'une répllication *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN [142]. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). La puissance de la PCR repose sur le fait que l'on peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN. La PCR est donc une technique de purification ou de clonage. A la fin de la réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très grande [143]

La PCR a connu un tournant décisif avec la découverte de l'ADN polymérase thermostable chez une bactérie : *thermophilus aquaticus*, elle a permis d'envisager des thermocycleurs ou sont programmables les différentes étapes de toute amplification génique sans perdre l'activité de l'enzyme [144].

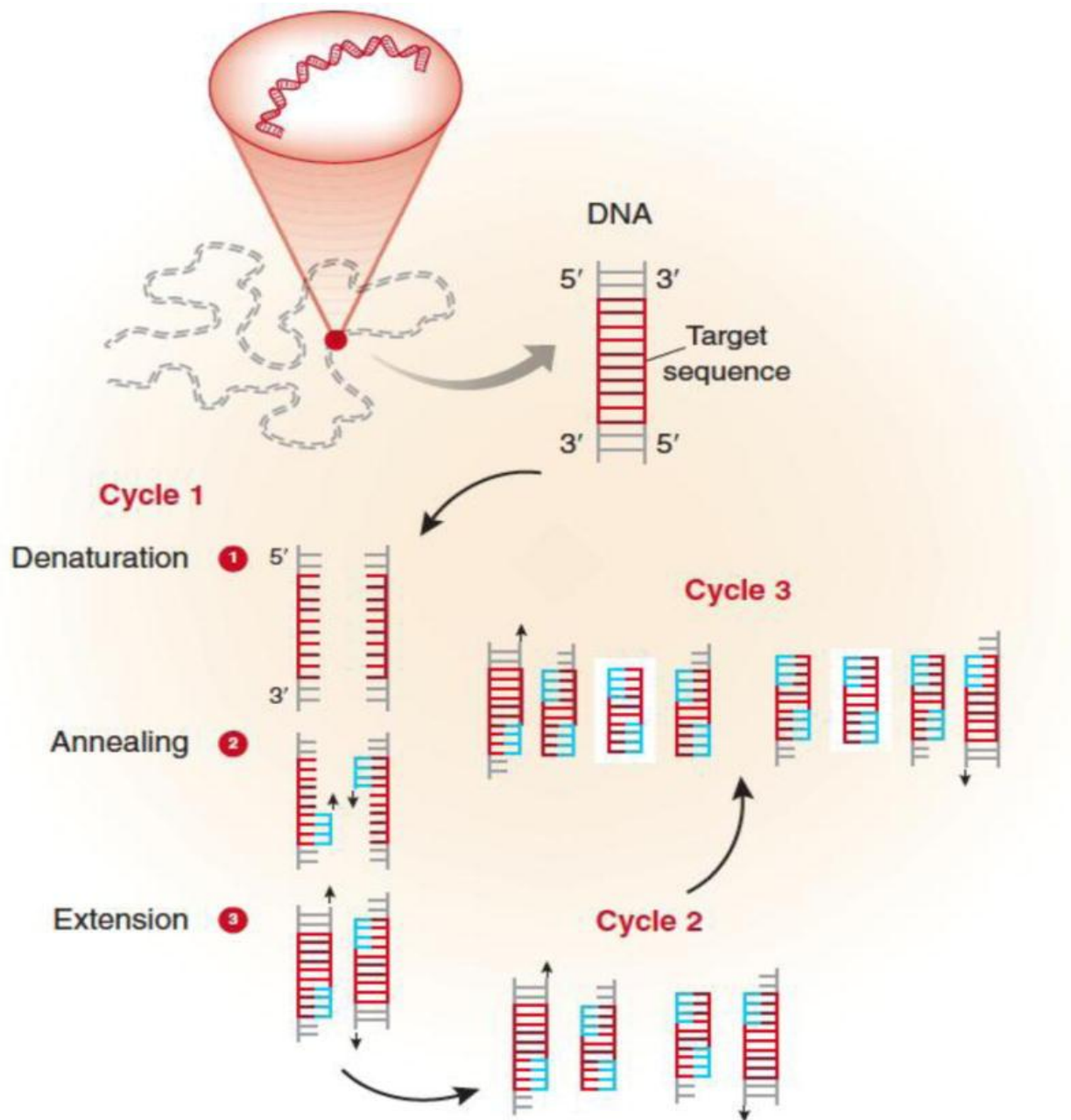


Figure 27 : Différentes étapes et cycles de la technique PCR

[Tirée de : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/figure/F1/>]

Dans la majorité des laboratoires, la technique PCR reste la plus utilisée. La plupart des tests de sensibilité génotypiques ont été développés sur des combinaisons bactérie-antibiotique pour lesquelles les bases génétiques de la résistance se limitent à une seule ou quelques anomalies génétiques bien caractérisées.

Exemple : Détection génotypique des résistances chez *Staphylococcus aureus* :

Un exemple d'application de la technique PCR est la détection du gène *mecA* pour les staphylocoques. Une détection rapide et fiable de la résistance à la méthicilline des staphylocoques dorés à partir des tests de sensibilité sur isolat obtenu par culture n'est pas sans poser des problèmes.

L'expression de la méthicillino résistance peut être hétérogène et dépendante des conditions de réalisation de la culture. Les techniques phénotypiques peuvent alors surestimer ou sous-estimer la fréquence ou le niveau de résistance. Or, toutes les souches de staphylocoques dorés résistants à la méthicilline produisent une protéine liant la pénicilline (PLP2a) dont le gène chromosomique est *mec* [145]. Ce gène n'est pas présent dans les souches sensibles à la méthicilline. Par conséquent, la détection génotypique du gène *mecA* est devenue le test référence pour la détection et la confirmation de la résistance à la méthicilline. [146][147].

Plusieurs études ont montré une excellente corrélation entre la détection par PCR du gène *mecA* et les résultats obtenus par test de sensibilité en microdilution. La méthode PCR permet aussi de mieux différencier entre *Staphylococcus aureus* de haute résistance et de résistance intermédiaire [147]. La PCR peut détecter des séquences de gène *mecA* à partir de prélèvements biologiques de pratique courante et directement à partir des flacons d'hémocultures [148] [149]. Cependant, cette détection nécessite une interprétation appropriée car elle peut correspondre à un

staphylocoque coagulase négatif, de plus que la présence de variantes de gène *mec* peut faussement négativer la réaction. Ces faux négatifs peuvent être le fait de mutations du gène *mecA* ou l'existence de gènes proches, mais différents, conférant la méticillinorésistance [150].

Ce rapport sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) codant pour un gène « *mecA* » divergent était hautement significatif. Ce gène homologue, désigné par *mecC*, pose des problèmes diagnostiques avec la possibilité d'être diagnostiqué à tort comme *S. aureus* sensible à la méthicilline, avec des conséquences potentielles importantes pour les patients individuels et pour la surveillance du SARM [119]. Inversement, il existe des souches porteuses du gène *mecA* mais phénotypiquement sensibles sur antibiogramme (souches OS-MRSA) [151] [152]. La décision dans ces cas est en faveur des tests génétiques.

Actuellement, les recommandations en matière de détection moléculaire de résistances importantes chez les Staphylocoques sont établies par l'EUCAST 2017, qui note que la détection génotypique des gènes *mecA* et *mecC* par PCR doit être entreprise [153] [120].

### C-Hybridation sur puces:

Dans cette étude, nous évaluons pour la première fois le test Sepsis Flow Chip, qui est un nouveau test diagnostique pour la détection rapide simultanée de la grande majorité des pathogènes sanguins, y compris les bactéries Gram-positives et Gram-négatives et les champignons, dans le même dosage, et pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques les plus courants.

Le test SFC est basé sur une amplification PCR multiplex utilisant des amorces biotinylées suivie d'une hybridation inverse automatique dans des membranes contenant des sondes spécifiques pour détecter les pathogènes les plus importants associés aux infections sanguines et les déterminants de résistance génétique les plus importants dans ces microorganismes. Les signaux positifs sont visualisés via une réaction immunoenzymatique colorimétrique dans une membrane à puce (*Figure 24*) par la plateforme d'hybridation HS24. La plate-forme d'hybridation HS24 possède une caméra intégrée qui capture l'image de la puce puis est analysée dans la plate-forme par le logiciel hybrisoft qui identifie le motif de points qui apparaît sur la membrane. Chaque motif de points est associé à un micro-organisme et les déterminants de la résistance génétique et le logiciel hybrisoft fournit à l'utilisateur un résultat. Le test SFC détecte les principaux déterminants de la résistance génétique impliqués dans la résistance à la méthicilline et à la vancomycine chez les pathogènes à Gram positif et les déterminants liés aux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines tels que les BLSE et la production de carbapénémases chez les bactéries Gram négatif (Tableau 6). Le test est réalisé directement à partir d'une hémoculture positive en utilisant un volume minimum (10  $\mu$ l). Cette nouvelle méthode semble très prometteuse en combinant le nombre élevé de pathogènes distincts et de déterminants de la résistance génétique identifiés dans un seul essai. Des recherches supplémentaires devraient être menées pour évaluer l'utilité de ce

test en association avec des groupes cliniques multidisciplinaires (intendance), afin que les résultats soient appliqués de manière appropriée à la gestion des processus infectieux des patients [158].

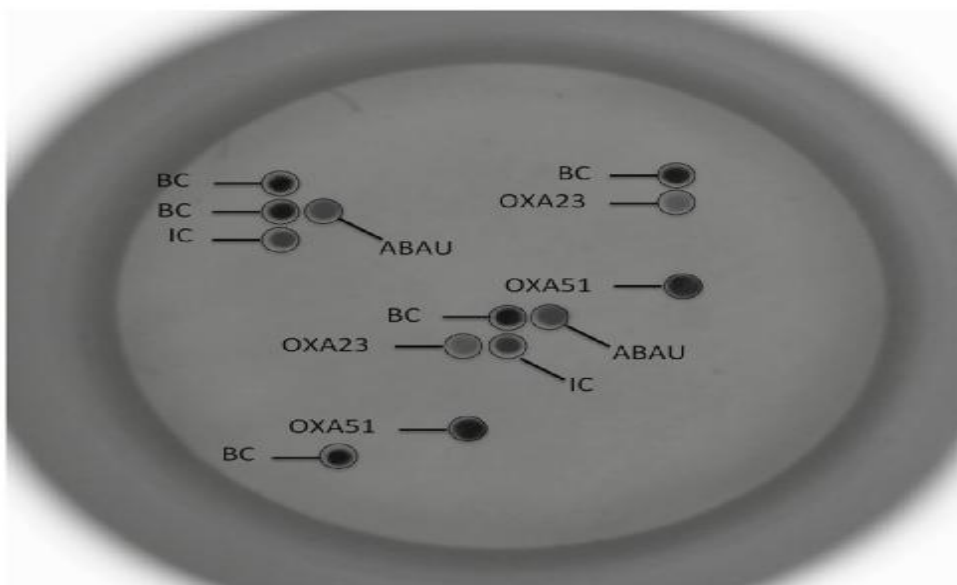


Figure 28 : Souche productrice de *A. baumannii* carbapenemase multi-résistante aux médicaments analysée par dosage SFC.

[Source : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177627.g001>]

Toutes les sondes cibles sont en double sur la matrice et un résultat est considéré comme positif si les deux signaux sont détectés.

Sondes positives détectées: contrôle de la biotine (BC), contrôle interne (IC), *A. baumannii* (ABAU), blaOXA-23 (OXA23) et blaOXA-51 (OXA51).

L'image est agrandie x10 en ce qui concerne la taille réelle de la puce

Tableau 6 : les principaux déterminants de la résistance génétique impliqués dans la résistance à la méthicilline et à la vancomycine chez les pathogènes à Gram positif et les déterminants liés aux mécanismes de résistance des BLSE et la production de carbapénémases chez les bactéries Gram négatif

| Pathogen Identification             | Genetic Resistance Determinants   |   |
|-------------------------------------|---|---|
| <b>Gram-positive Bacteria</b>       | -   |   |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>     | -   |   |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>     | -   |   |
| <i>Streptococcus spp.</i>           | -   |   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>        | <i>mecA</i>   |   |
| <i>Staphylococcus spp.</i>          |   |   |
| <i>Enterococcus spp.</i>            | <i>vanA/B</i>   |   |
| <i>Listeria monocytogenes</i>       | -   |   |
| <b>Gram-negative Bacteria</b>       |   |   |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | <i>blaCTX, blaSHV, blaSME, blaKPC, blaNMC/IMI, blaGES, blaIMP, blaGIM, blaVIM, blaSPM, blaSIM, blaNDM, blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-48, blaOXA-51 and blaOXA-58</i> |   |
| <i>Serratia marcescens</i>          |   |   |
| <i>Escherichia coli</i>             |   |   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        |   |   |
| <i>Morganella morganii</i>          |   |   |
| <i>Proteus spp.</i>                 |   |   |
| <i>Enterobacteriaceae</i>           |   |   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>      |   |   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       |   |   |
| <i>Neisseria meningitidis</i>       |   |   |
| <b>Fungi</b>                        |   |   |
| <i>Candida albicans</i>             |   | - |

Identification panel of SFC assay including gram-positive, gram-negative and fungi pathogens. Genetic resistance determinants identification include the main mechanisms for gram-positive pathogens and the main ESBL and carbapenemases in gram-negative pathogens.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177627.t001>

## D-Le séquençage partiel ou total de gènes :

L'avènement des méthodes de séquençage d'ADN de nouvelle génération a déclenché une nouvelle ère dans la caractérisation moléculaire des écosystèmes environnementaux. Le principal avantage de ces méthodes est qu'elles contournent la PCR et donc, *a priori*, le besoin de sélectionner des cibles génétiques, telles que des ARGs (*Antibiotic Resistance Genes*) spécifiques et des éléments génétiques mobiles. Les génomes mélangés dans un échantillon donné (métagénomes) peuvent être séquencés en une seule étape (par exemple, en donnant 10 à 1000 Gb de séquences d'ADN dans une seule voie au séquenceur HiSeq 2500 Illumina™). Les gènes de résistance aux antibiotiques ou autres cibles d'intérêt (Plasmides, transposons, facteurs de virulence, ...) peuvent ensuite être détectés et quantifiés en cherchant dans des bases de données en ligne à l'aide d'outils publics tels que MG-RAST (*Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology*) [159], la base de données intégrée sur le génome microbien (IMG) [160] ou la base de données complète sur la résistance aux antibiotiques (CARD) [161] [156].

## E- La confrontation phénotypique et génotypique : une adaptation nécessaire à l'interprétation des résultats :

Les techniques de biologie moléculaire ont démontré leur utilité pour confirmer des résistances bactériennes sur des germes isolés en laboratoire et pour détecter des résistances sur divers prélèvements en contexte clinique [154] [155]. ainsi que dans l'environnement [156] ou chez l'animal [157].

Le premier avantage des tests de sensibilité par analyse génétique est de pouvoir être réalisé directement sur les prélèvements biologiques, en évitant l'isolement préalable du germe en culture.

Cette stratégie opérationnelle est particulièrement importante si on considère le pronostic vital des infections sévères telles que les méningites, les bactériémies ou toute infection nécessitant des traitements antibiotiques prolongés comme les endocardites ou les ostéites ; dans d'autres cas, lorsque les bactéries ont une croissance lente, les génotypes peuvent permettre une identification dans des délais plus courts que les déterminations de phénotype ; et pour certains microbes non cultivables ou difficilement cultivables, seuls les génotypes peuvent être discriminants.

Cependant, dans certaines circonstances, les tests génotypiques sont moins utiles que les tests de sensibilité phénotypique conventionnels. Ils peuvent manquer de sensibilité lorsque plusieurs germes sont présents dans le prélèvement et l'on ne peut chercher que « les cibles » qu'on connaît et dont on dispose de réactifs correspondant. Toute nouveauté chez les bactéries restera mystérieuse le temps qu'elle pose problème, qu'on la cherche et qu'on l'identifie. Ce n'est qu'après tout ce travail de recherche fondamentale que des réactifs adaptés peuvent être élaborés. Différentes analyses sont nécessaires pour chaque antibiotique testé car les divers antibiotiques peuvent être associés à une multitude de gènes cibles ou à un large panel de mutations. En outre, certains antibiotiques ne disposent pas de tests génétiques de résistance correspondants.

## V-Limites et Perspectives

La résistance bactérienne aux antibiotiques (RBAB) est un sujet préoccupant sur le plan de la prise en charge des infections bactériennes en ville, mais surtout à l'hôpital dans tous les pays du monde. Étudier cette résistance sur antibiogrammes ou à l'échelle physicochimique ou moléculaire est très vaste et difficile, nécessitant un effort multidisciplinaire : sciences fondamentales, centres de références, unités de recherche, laboratoires fabricants de réactifs et d'appareils de diagnostic, secteurs de l'agroalimentaire, domaine vétérinaire, ..., pour donner au microbiologiste médical un protocole opératoire de mise en évidence des résistances, dont il mettra les résultats à la disposition des médecins traitants pour une meilleure prise en charge des patients.

Les techniques phénotypiques de mise en évidence de la RBAB sont recommandées par toutes les sociétés savantes, mais elles ne sont pas toujours faciles à réaliser ni à interpréter. Le fait qu'elles soient basées sur la culture garantit la disponibilité de la souche pour de plus amples tests, mais retarde la réponse à donner au clinicien, d'autant plus vrai que la bactérie est fastidieuse (*Mycobacterium tuberculosis complex*), ou anaérobies, *Neisseria* pathogènes, ... Dans d'autres cas, la culture est impossible ou difficile (Tréponèmes, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydiae*, Rickettsies, Mycoplasmes, ...) empêchant l'application de ces méthodes classiques. C'est là tout l'intérêt des méthodes s'affranchissant de la culture : biologie moléculaires (mise en évidence d'acides nucléiques) et les techniques physicochimiques basées sur la spectrométrie de masse.

Ces nouvelles approches ont révolutionné le diagnostic bactériologique (identification rapide de bactéries dans les prélèvements cliniques et mise en évidence des résistances bactériennes). Elles associent une rapidité tellement utile et une fiabilité assurées par l'automatisme et l'analyse basée sur des systèmes

« expert » informatiques garantissant la rapidité, la précision et l'objectivité. Le vrai challenge pour nous est de disposer d'un budget permettant d'investir dans l'achat du matériel, des équipements et des réactifs nécessaires à leur mise en œuvre, d'une part ; avoir du personnel suffisant et qualifié pour réaliser au quotidien ces nouvelles techniques, d'autre part. Enfin, s'inscrire dans un cadre national et international de d'assurance qualité pérenne.

Dans ce travail de thèse, nous avons fait une mise au point sur le sujet de la RBAB. Il est certain qu'il existe plusieurs angles de vue et plusieurs points d'abord. Nous avons choisi de faire des rappels sur les antibiotiques et leur mécanismes d'action ; sur les mécanismes biochimiques et les déterminismes génétiques de la RBAB. Le domaine est tellement vaste qu'il est impossible de tout invoquer. Nous avons donc fait un choix, celui de rapporter les résistances les plus fréquentes dans notre région, à savoir : les bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) fréquemment exprimées par les Entérobactéries (51% des BMR à l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès), la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (15%), résistance aux carbapénèmes (11% uniquement par les Entérobactéries). Précisons que *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (15% associés) sont concernés par ces résistances (BLSE et/ou carbapénémases) et par les céphalosporinases (AmpC) hyperproduites ou par des problèmes de perméabilité. Ce qui fait que la majorité des BMR de notre région sont concernés par ces rappels. Côté antibiotiques, il faut noter que seules les bêta-lactamines sont les plus concernées par l'analyse des phénotypes et les tests complémentaires à l'antibiogramme des disques. Ce n'est pas le cas des autres classes ou familles (Fluoroquinolones, Aminoglycosides, Macrolides et apparentés, Glycopeptides, ...). C'est pour cela que nous n'avons pas rapporté les techniques concernant ces

molécules, les tests correspondants sont toutefois mentionnés dans les recommandations annuelles de l'EUCAST.

Les techniques classiques d'antibiogramme de diffusion sur gélose sont pratiquées dans nos laboratoires, mais les déterminations de CMI et, à moindre mesure, les CMB sont très peu appréhendées sauf si l'on est équipé en automates d'identification et d'antibiogramme (cas du Laboratoire Central de Microbiologie et de sérologie du CHU Hassan II de Fès). En matière de Biologie moléculaire, mis à part quelques tests d'identification (Ex : *Mycobacterium tuberculosis complex*), nous ne sommes pas encore inscrits dans la détection de la RBAB par des méthodes ne se basant pas sur la culture.

C'est une perspective d'avenir très proche vu leur apport crucial et indéniable dans la prise en charge précoce des patients souffrant d'infections ; et vu la nécessité et l'obligation pour nos laboratoires d'évoluer et de se développer pour répondre aux besoins cliniciens purs et aux attentes en matière de formation de nos stagiaires, internes ou résidents en biologie médicale.

# CONCLUSION

Les antibiotiques sont cruciaux dans les soins de santé humains. Ils sont utilisés dans le traitement des maladies infectieuses bactériennes et en prophylaxie des interventions chirurgicales. Les antibiotiques sont également largement utilisés dans les traitements vétérinaires du bétail et des animaux domestiques et comme stimulateurs de croissance en aquaculture. La production et consommation mondiales d'antibiotiques à usage humain est évaluée à 40 milliards de dollars par an et est en augmentation.

Toutefois, deux problématiques viennent assombrir l'avenir de l'humanité :

1) Le tarissement de la recherche et de la commercialisation de nouveaux antibiotiques parce que les grandes firmes prétendent n'en tirer pas de profits et que les infections sont des maladies des pauvres et la durée des traitements courte par rapport à d'autres secteurs plus juteux.

2) La résistance bactérienne aux antibiotiques qui accentue les craintes des firmes pharmaceutiques (quant à l'impact négatif sur le retour d'investissement) et fait planer sur l'humanité la menace de ne plus pouvoir traiter certaines infections, très fréquentes dans les établissements de soins de par le monde.

La communauté mondiale dispose de suffisamment d'outils et de connaissances pour gérer efficacement la résistance aux antimicrobiens et ainsi parvenir à un monde plus sûr et plus sain pour tous. Dans cette optique s'inscrit le rôle du laboratoire de bactériologie qui intervient dans ce domaine à différents niveaux :

1) Niveau 1 : diagnostic des infections : (Examen direct (ED) et/ou sérologie). Cela permet une prise en charge thérapeutique probablement efficace ; mais cette approche est insuffisante.

2) Niveau 2 : diagnostic complet des infections bactériennes (ED, culture, tests de sensibilité ou antibiogramme). Dans ce cas, le traitement probabiliste des 2 ou 3

premiers jours, sera adapté en fonction du profil de résistance de la souche impliquée, sauf dans des situations d'impasse

3) Niveau 3 : associer à ces méthodes classiques, les techniques nouvelles dites de biologie moléculaires : Hybridation, Amplification génique (ADN ou ARN), séquençage, ... Leur intérêt est évident : rapidité, spécificité, sensibilité, ... cependant, elles exigent un investissement colossal (matériel, savoir-faire, locaux, réactifs, contrôles de qualité, mises à jour ...) et ne permettent pas de disposer de la souche responsable de l'infection.

L'idéal est de disposer des moyens classiques et de certains équipements modernes et s'inscrire dans un cadre national, voire international, de collaboration, de pôles d'excellence et d'assurance qualité.

# RESUMES:

## RESUME:

Titre : résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au laboratoire.

Auteur : HAJAR HNICH

Mots clés : Antibiotique- Résistance bactérienne - Mécanismes –Méthodes de détection-Antibiogramme.

Les antibiotiques sont considérés comme une révolution de la médecine humaine du 20<sup>ème</sup> siècle, et dès leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses, on a assisté à une émergence, de la part des bactéries, des moyens de résister à ces traitements. Cette résistance est un phénomène naturel, mais qui est accéléré par l'usage intempestif des antibiotiques chez l'homme et en agroalimentaire.

La situation actuelle est que la résistance bactérienne est un problème de santé publique dans tous les pays. Des situations d'impasse thérapeutique ne sont pas exceptionnelles notamment dans les établissements de santé ou des bactéries comme *Acinetobacterbaumanni*, *Pseudomonas aéroginosa*, entérobactéries productrices des betalactamases et *staphylococcus auréus* résistant à la méthicilline, sont à l'origine de l'excès de la morbi-mortalité.

Le Maroc doit encore faire des efforts en matière de connaissance et des mesures à prendre au quotidien pour juguler ce phénomène et préserver l'activité des antibiotiques.

Par conséquent, nous avons jugé qu'il est important de rappeler cette problématique par une revue sur les antibiotiques, leurs modes d'action et les mécanismes de résistance ainsi que les moyens déployés par les microbiologistes pour les mettre en évidence. Le but essentiel est une bonne prise en charge des patients et la participation de tous les acteurs de santé à la lutte contre les bactéries multi résistants dans notre pays.

## Abstract:

Title: bacterial resistance: mechanisms and detection methods in the laboratory.

Author: HAJAR HNICHT

Key words: Antibiotic - Bacterial resistance - Mechanisms - Detection methods-antibiogramm.

Antibiotics are considered as the revolution of medicine in the 20th century, and as soon as they were introduced to the treatment of infectious diseases, bacteria have developed means of resistance to these treatments. This resistance is a natural phenomenon, but it is accelerated by anarchic use of antibiotics.

The current situation is that bacterial resistance is a public health problem in all countries. Therapeutic stalemate situations are not exceptional, especially in health care institutions, or bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, beta-lactamase-producing enteric bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are at the origin of excess morbidity, mortality.

Morocco still has to make efforts in terms of knowledge and daily measures to curb this phenomenon and preserve the activity of antibiotics.

Therefore, we saw that it is important to recall this issue through a review of antibiotics, their modes of action, resistance mechanisms and the means deployed by microbiologists to detect them. The main goal is a good care of patients and the participation of all health actors in the fight against multi-resistant bacteria in our country.



# RÉFÉRENCES

- [1]- Aminov RI: A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future .*Front Microbiol.* 2010, 1:134. 10.3389/fmicb.2010.00134.
- [2]- Zaman S, Hussain M, Nye R, et al. (June 28, 2017) A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus* 9(6): e1403. DOI 10.7759/cureus.1403.
- [3]- Abraham EP, Chain E: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin .*Nature.* 1940, 146:837. 10.1038/146837a0.
- [4]- Chopra R, Alderborn G, Podczec F, et al.: The influence of pellet shape and surface properties on the drug release from uncoated and coated pellets. *Int J Pharm.* 2002, 239:171–178. 10.1016/S0378-5173(02)00104-7
- [5]- Gootz TD: Discovery and development of new antimicrobial agents . *Clin Microbiol Rev.* 1990, 3: 13–31. 10.1128/CMR.3.1.13.
- [6]- Jevons MP: "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J.* 1961, 1:124–125.
- [7]- Yoneyama H., Katsumata R., Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70, 1060–1075.
- [8]- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA BIOHAZ Panel (European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards) and CVMP (EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use), 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 2017;15(10):5017, 70 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5017>
- [9]- Slayton RB, Toth D, Lee BY, Tanner W, Bartsch SM, Khader K, et al. Vital Signs: Estimated Effects of a Coordinated Approach for Action to Reduce Antibiotic-Resistant Infections in Health Care Facilities - United States. *MMWR / August 4, 2015 / Vol. 64: 1-7.*

- [10]- Davies SC, Fowler T, Watson J, Livermore DM, Walker D. Annual report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2013 May 11;381(9878):1606–9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60604-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60604-2) PMID: 23489756.
- [11]- Steven J Hoffman, Grazia M Caleo, Nils Daulaire, Stefan Elbe et al. Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ* 2015 ;93:867–876 | doi : <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.15.153171>
- [12]- Martens E , Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017 May; 70(5):520-526. doi: 10.1038/ja.2017.30. Epub 2017 Mar 1.
- [13]- Levy SB, Marshall B: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*.2004, 10 : 122-129. 10.1038/nml 145.
- [14]- P. Vuillemin. *Antibiose et symbiose*, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18<sup>e</sup> session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11 (1890), p. 525-543.
- [15]- Darguere JM. antibiotiques : intérêts, limites alternatives naturelles: <http://presse.signesetsens.com/science/lhistoire-des-antibiotiques.html>.
- [16]- Emmerich R. and Löw O. "Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben". *Zeitschrift für Hygiene*. 31: 1–65
- [17]- Adriane Gelpi, Adam Gilbertson et Joseph D.tucker : Magic bullet paul ehrlich, salvarsan and the birth of venereology. *Soc Hist Med*.2003 : 16 : 437-59.
- [18]- pouillard J A forgotten discovery: doctor of medicine Ernest Duchesne's thesis (1874-1912) *hist sci med* 2002 jan-mar 36 (1) :11-20

- [19]- Brown, K. (2004). *Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution*. 320 pp. Sutton Publishing. ISBN 0-7509-3152-3.
- [20]- Evans, Ruth (8 January 2004). "Obituary: Norman Heatley". Guardian Unlimited. Guardian Newspapers Limited. Retrieved 2006-08-04.
- [21]- Bentley.R et Bennett J.W, « What is an Antibiotic? Revisited », *Advances in applied microbiology*, vol. 52, 2003, p. 303-331, spéc. 304, 312 et 330
- [22]- MAZLIAK Paul. Antibiotiques (repères chronologiques) <https://www.universalis.fr/encyclopedie/antibiotiques-reperes-chronologiques/>
- [23]- Calderon CB, Sabundayo BP (2007). *Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs*. In Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press. Taylor & Frances group. ISBN 978-0-8247-4100-6
- [24]- Weber M. Antibiogramme en pratique courante. In Précis de Bactériologie Clinique. Freney J et Coll. Ed ESKA ; 2007. p609-634.
- [25]- Anonyme : Syllabus national belge de Pharmacologie - Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse. Section 2: pharmacologie spéciale des antibiotiques. <http://www.farm.ucl.ac.be/FARM2233/syllabus-antibiotiques-antifongiques-2009.pdf>.
- [26]- Fisher, J. F.; Meroueh, S. O.; Mobashery, S. (2005). "Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity†". *Chemical Reviews*. 105 (2): 395-424. doi:10.1021/cr030102i. PMID 15700950.
- [27]- Höltje J.V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* March 1998 vol. 62 no. 1. p181-203.

- [28]- Lee TK, Huang KC. The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16(6): 760-766.
- [29]- Jehl F, Chomar M, Weber M, Gérard A. *In De l'antibiogramme à la Prescription*. Editions BioMérieux. 2003
- [30]- Weber M. AntibioGramme en pratique courante. In *Précis de Bactériologie Clinique*. Freney J et Coll. Ed ESKA ; 2007. p609-634.
- [31]- Varon E, Gutmann I. Résistance aux antibiotiques : le modèle bêta-lactamines est-il transposable aux fluoroquinolones. *Med Mal Infect* ; 2002 (32) suppl 1 : 45-49
- [32]- Guillot J.F. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1989, 20 (1), pp.3-16
- [33]- Barber, Mary (1947-11-29). "Staphylococcal Infection due to Penicillin-Resistant Strains". *British Medical Journal*. 2 (4534): 863-865. [doi:10.1136/bmj.2.4534.863](https://doi.org/10.1136/bmj.2.4534.863).
- [34]- Julian Davien and Dorothy Davis Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, *Microbiol Mol Biol Rev* 2010 Sep ; 74 (3) 417-433
- [35]- *Current Topics in Microbiology and Immunology* edition 1971 p.47
- [36]- M Couturier, F Bex, PL Bergquist and WK Maas identification and classification of bacterial plasmids *Microbiol Rev* 1988 Sep; 52(3): 375-395
- [37]- RW Hedges, AE Jacob : transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. February 1974 DOI : 10.1007/BF00268228 source : pub med
- [38]- AD Russell : The role of plasmids in bacterial resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives, *Journal of Hospital Infections* volume 6 issue 1 march 1985 pages 9-19

- [39]- Larry M. Bush, Charles E. Schmidt. Overview of Bacteria. (2017)  
<http://www.merckmanuals.com/home/infections/bacterial-infections/overview-of-bacteria>
- [40]- Levy SB: From tragedy the antibiotic age is born . The Antibiotic Paradox. Springer;1992. 1-12.
- [41]- Levy SB: Antibiotic Resistance: An Ecological Im balance, in Ciba Foundation Symposium 2007- Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Chadwick DJ, Goode J. John Wiley & Sons, Ltd. (ed): Chichester, UK, 2007; 2007. 1:1-14. 10.1002/9780470515358.ch1.
- [42]- LOZNIIEWSKI A., RABAUD C. Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins CCLIN Sud-Est. Nancy. Juillet 2010
- [43]- Wright G.D., Bacterial resistance to antibiotics : enzymatic degradation and modification, Adv. Drug Deliv.Rev., 2005,57, 1451-1470
- [44]- BI Colulescu., antimicrobiol resistance induced by genetic changes, J. Med Life 2008 April 15; 2(2):114-123.
- [45]- Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. Mechanism of chromosomal transfer of Enterococcus faecalis pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jul 6;107(27):12269-74.
- [46]- poole K., Resistance to beta-lactam antibiotics, Cell Mol.Life Sci., 2004, 61, 2200-2223. On en distingue plusieurs classes :
- [47]- Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery., Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics : compemmi,g opportunism, compelling opportunity, Chem.Rev., 2005,105, 395-424.

- [48]- Kashyap G, Gupta S, Mamoria VP, et al. Increasing prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBLs) producing E. coli and Klebsiella spp in outpatient departments (OPDS) patients in urinary tract infections (UTIS) in tertiary care hospital. *Int J Curr Res Rev.* 2013;5(11):80-5.
- [49]- Dhillon RHP, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? *Crit Care Res Pract.* 2012;1-11.
- [50]- Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Iss Mol Biol.* 2014;17:11-22.
- [51]- Sibhghatulla Shaikh and al Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment *Saudi J Biol Sci.* 2015 Jan; 22(1): 90-101.
- [52]- Ben-Ami Rand al., A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2009 Sep 1;49(5):682-90. doi: 10.1086/604713
- [53]- Rodríguez-Baño J  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts *Clin Infect Dis.* 2012 Jan 15;54(2):167-74. doi: 10.1093/cid/cir790. Epub 2011 Nov 4
- [54]- Shahid M., Aminoglycosidic aminocyclitol antibiotics –A wonder, but toxic drugs: developments and clinical implications, *Anti-infect.Agent Med. Chem.,* 2007,6,107-117
- [55]- Mariya Morar, Kate Pengelly, Kalinka Koteva, and Gerard D. Wright Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes *Biochemistry,* 2012, 51 (8), pp 1740-1751 DOI: 10.1021/bi201790u

- [56]- Ari Robicsek, Jacob Strahilevitz, George A Jacoby, Mark Macielag Darren Abbanat Chi Hye Park Karen Bush, & David C Hooper, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase *Nature Medicine* 12, 83–88 (2006) doi:10.1038/nm1347
- [57]- katrijin Bocksteal, Arthur Van Aerschot., Antimicrobial resistance in bacteria Cent. Eur.J. Med 4(2) 2009 141-155 DOI/ 10 2478/s 11536-008-0088-9
- [58]- Kahne D., Leimkuhler C., Lu W. , Walsh C., Glycopeptides and lipoglycopeptide antibiotics, Chem. Rev., 2005, 105, 425-448
- [59]- George M.Eliopoulos, H.S.Gold., Vancomycin-Resistant Enterococci : Mechanisms and clinical Observations; *Clinical Infectious Diseases*, Volume 33, Issue 2, 15 July 2001, Pages 210–219.
- [60]- Wilke M.S., Lovering A.L Strynadka N.C., Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective, Curr. Opin. Microbiol., 2005, 8, 525-533
- [61]- Sköld O Resistance to trimethoprim and sulfonamides Vet Res. 2001 May-Aug; 32(3-4):261-73.
- [62]- Hooper D.C., Mechanisms of actions of antimicrobiols : focus on fluoroquinolones, Clin.Infect.Dis., 2001, 32 Suppl 1, S9-S15
- [63]- Wise R., A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents, Can. Respir. J., 1999, 6Suppl A, 20A–22A
- [64]- ana S., Deb J.K., Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 70, 140–150
- [65]- M. A. Webber L. J. V. Piddock The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, January 2003 Volume 51, Issue 1, 1 January 2003, Pages 9–11
- [66] Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. Annu. Rev. Biochem ; 2009. 78, 119–146.

- [67] S HERNANDO-AMADO, P BLANCO, M ALCALDE-RICO, F CORONA, J A. REALES-CALDERON, M B. SANCHEZ, J L. MARTINEZ. Drug Resistance Updates, 2016 (28): 13–27.
- [68]- Zuzanna Kaźmierczak,\* Andrzej Górski, and Krystyna Dąbrowska *Facing Antibiotic Resistance: Staphylococcus aureus Phages as a Medical Tool* Published online 2014 Jul 1. doi: [10.3390/v6072551](https://doi.org/10.3390/v6072551)
- [69]- Liam S. Redgrave ,Sam B. Sutton\*Mark A. Webber, Laura J.V. Piddock\*, Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- [70] EL BRAHMI REDOUANE. PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE ET DE RESISTANCE DES BACTERIES MULTI RESISTANTES AU CHU HASSAN II DE FÈS. Thèse Doctorat Médecine. N°168/13. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fès. 2013.
- [71]- Antimicrobial resistance : Global report on surveillance OMS ; 2014
- [72]- Sekhsokh Y., Chadli M., El Hamzaoui S.A. Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. Médecine et maladies infectieuses. 2008; 38 : 324–32
- [73]- Tagajdid M.R., Boumhil L. , Iken M., Adnaoui M., Benouda A. Étude de la résistance des souches d'Escherichia coli isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. Médecine et maladies infectieuses. 2010 ; 40 : 70–73
- [74]- Arsalane L., Zouhair S., Lahlou I., Louzi L., Bouskraoui M. Infection urinaire du nourrisson (376 cas) dans un hôpital marocain (2009–2010) – fréquence étiologique et prévalence de la résistance. Pathologie Biologie 2012 ; 60 : e90–e91

- [75]- Thèse en Médecine 40/10, Quassimi L. Epidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas).
- [76]- Nadmia H., Elotmani F., Talmi M., Zerouali K., Perrier-Gros-Claude J.D , Timinouni M. Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). Médecine et maladies infectieuses. 2010 ; 40 : 303-305.
- [77]- Serragui S. Derraji S. Mahassine F. Cherrah Y. Résistance bactérienne : états des lieux au Maroc. Maroc médical.2013, tome 35 n 3, pp.199-205
- [78] Kumazawa J, Yagisawa M. The history of antibiotics: The Japanese story. Journal of Infection and Chemotherapy. June 2002, Volume 8, Issue 2, pp 125-133
- [79] Anonyme. Résistance aux antibiotiques : de nouveaux éléments concernant la colistine. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- [80]-DortetL, Bonnin R, JoussetA, GauthierL, Naas T. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance !*Journal des Anti-infectieux*. 2016 (18), Issue 4 : 139-159
- [81]-Tan C, Phillip Smith R, Srimani JK, Riccione KA, Prasada S, Kuehn M, You L: The inoculum effect and band-pass bacterial response to periodic antibiotic treatment. Mol Syst Biol 2012, 8:617 <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2012.49>.
- [82]-Boyle KE, Heilmann S, van Ditmarsch D, Xavier JB: Exploiting social evolution in biofilms. Curr Opin Microbiol 2013, 16:207- 212
- [83]-Kirby AE, Garner K, Levin BR: The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2012, 56:2967-2975 <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06480-11>

- [84]-Boettcher T, Kolodkin-Gal I, Kolter R, Losick R, Clardy J: Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors. *J Am Chem Soc* 2013, 135:2927–2930
- [85]-Vega NM, Gore J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications *Current Opinion in Microbiology* 2014, 21:28–34
- [86]-Ruppé E. Sept questions autour du microbiote intestinal et de la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux (2015) 17, 7–11*
- [87]-Wellington EMH, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* 2013;13:155—65
- [88]-Singh R, van Nood E, Nieuwdorp M, van Dam B, Ten Berge IJM, Geerlings SE, et al. Donor feces infusion for eradication of extended spectrum beta-Lactamase producing *Escherichia coli* in a patient with end stage renal disease. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(11):977—8
- [89] Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-infectieux (2015) 17, 125—139.*
- [90]- Seydina M. Diene. Détermination de la sensibilité et de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens. *Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie (www.aemip.fr). 2016]*
- [91]-Burnichon N, Texier A. L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques ; DES de bactériologie. 2003. [http://microcsb.net/IMG/pdf/Antibiogramme\\_csb.pdf](http://microcsb.net/IMG/pdf/Antibiogramme_csb.pdf)
- [92]-Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Revue francophone des laboratoires. Volume 2016, n° 482 : 49-59*

- [93]-Riegel P, de Brielb D, Dauwalderc O. Automatisation de l'identification bactérienne. *Revue Francophone des Laboratoires* - Mai 2016 - n°482 : 39-47
- [94]-ThomsonKS,Cornish NE,Hong SG.,Hemrick K,Herdt C,MolandES.Comparison of Phoenix and VITEK 2 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Detection Tests for Analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates with Well-Characterized  $\beta$ -Lactamases. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug; 45(8): 2380-2384.
- [95]-Hernández-DuránM, López-Jácome LE, Colín-Castro CA, Cerón-González G, Ortega-Peña S, Vanegas-Rodríguez ES, Mondragón-Eguiluz JA, Franco-Cendejas R. Comparison of the MicroScan WalkAway and VITEK 2 Compact systems for the identification and susceptibility of clinical Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Investigacion en Discapacidad, 2017, Vol. 6, No. 3 : 105-114.*
- [96]-Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis (2009) 9: 30.* <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-30>.
- [97]-Espinar MJ,Rocha R, Ribeiro M, Gonc A, Rodrigues A,Pina-Vaz C. Extended-spectrum b-lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *Journal of Medical Microbiology (2011), 60, 756-760*
- [98]-<https://resistancebacteriesantibiotiques.wordpress.com/2016/02/02/lecture-dun-antibiogramme/>
- [99]-Marcel JP. L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques ; Vol 7, N° 1 - février 2005 : pp. 53-58*
- [100]- Jehl F et Coll. Communiqué du CA-SFM / EUCAST. Mai 2014]

- [101]- [www.smamm.ma](http://www.smamm.ma)
- [102]- Matuschek E., Brown D. F. J. Kahlmeter G..Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014;20: O255–O266
- [103]- <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/bla/generalites.html>
- [104]- Jehl F. L'antibiogramme et son interprétation phénotypique en 2012. *Revue francophone des laboratoires, 2012 ; Vol 42, N° 445 : 37-39*
- [105]- Dortet L, Cuzon G. Nordmann P. Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. 2014, CNR Résistance aux antibiotiques. Inserm U914. ]
- [106]- Kashyap G, Gupta S, Mamoria VP, et al. Increasing prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBLs) producing *E. coli* and *Klebsiella spp* in outpatient departments (OPDS) patients in urinary tract infections (UTIS) in tertiary care hospital. *Int J Curr Res Rev. 2013;5(11):80-5.*
- [107]- Dhillon RHP, Clark J. ESBLs: a clear and present danger? *Crit Care Res Pract.* 2012:1-11.
- [108]- Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Iss Mol Biol.* 2014; 17:11-22.
- [109]- Vora S, Auckenthaler R. Que signifie « bêtalactamases à spectre élargi » en pratique ?. *Rev Med Suisse* 2009; volume 5 : 1991-1994]
- [110]- Philippon A, Arlet G.-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin* 2006 ; 64 (1) : 37-51]
- [111]- Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C. and Bogaerts P. - Evaluation of a new selective chromogenic medium for detection of Extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae. *J. Clin Microbiol* 2007; 45: 501-505.

- [112]-Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008 ; 14 : 90-103,
- [113]-Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 1019-25
- [114]- Elhani D. Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Ann Biol Clin* 2012 ; 70 (2) : 117-40.
- [115]- Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Evaluation of the chromogenic Cica-beta-Test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007 ; 60 : 1375-9.
- [116]-Hamdad F, Donda F, Laurans G, Canarelli B, Rousseau F, Biendo MD, Thomas D, Eb F. Performances des différentes méthodes de détection de la résistance à l'oxacilline de souches atypiques de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie*, 2006 ; Volume 54, n°8-9 pages 447-452.
- [117]-Hariman B. J. ; Tomasz A. Expression of methicillin resistance heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial-Agents chemother.*, 1986,29 : 85-92.
- [118]-Felten A, Grandry B, Lagrange HP, Casin I. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 2002; vol. 40, no. 8: 2766-2771]
- [119]-Paterson G. K., Harrison E. M et Holmes M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends. Microbiol.* 22, 42- 47.

- [120]-Anonyme: EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0. Juillet 2017.
- [121]- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
- [122]- Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme. Paris. Édition ESKA, 2006.
- [123]-Jehl F. L'interprétation phénotypique de l'antibiogramme. Rev Fr Lab 2012 ; 445 : 37-9.
- [124]- LeclercqR, Canton R, Brown DFJ, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. ClinMicrobiol Infect 2013; 19: 141-60.
- [125]- Jehl F, Twizeyimana E. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques : les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme. *Revue Francophone des Laboratoires - Novembre 2015 - n°476 : 47-61*
- [126]- Poirel L, Dortet L, Nordmann P. Diagnostic des carbapénémases : détection et caractérisation.*La Lettre de l'Infectiologue. juillet-août 2013 ;Tome XXVIII, n°4 : 128-132*
- [127]- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, European Network on C. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2012 ; 18:432-438
- [128] -Huang TD, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. J Antimicrob Chemother. 2014 Feb;69(2):445-50

- [129]- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001 ; 7:88-91.
- [130]-Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-\_-Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol. 41, no. 10, p. 4623-4629
- [131]-Stuart JC, Maurine A. Van Hall L. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010 ; Volume 36, Issue 3 : 205-210
- [132]-Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile \_BETA-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20(3):440].
- [133]-Turton JF et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA- 51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(8): 2974-2976.
- [134]-Figueiredo S. *Acinetobacter* spp. et réservoir de gènes de carbapénémases. *Médecine humaine et pathologie*. Université Paris Sud. Paris XI, 2011. Français. HAL Id: tel-00743039 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00743039>
- [135]- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology* 2010 Nov; 5(11): 1733-1754]
- [136]-Dauwalder O, Freydiere AM, Meugnier H, et al. Utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification bactérienne : Evaluation du système Axima/Saramis/SirWeb MALDI TOF. *BioTribune* 2011 2010; 37: 30-35

- [137]-Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T.. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2011 ;49: 3222-3227.
- [138]-Hrabak J, Chudackova E, Walkova R.. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013 ; 26:103-114
- [139]-Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2012. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:6437-6440
- [140]-Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 18:1503-1507.
- [141]-Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. 2013. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr; 20(4):340-344
- [142]-Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61. 64-65
- [143]-Weier HU, Gray JW. A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA*. 1988;7(6):441-7.
- [144]-Eom SH, Wang J, Steitz TA., « *Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site* », *Nature*, vol. 382, n° 6588, 18 juillet 1996, p. 278-281.

- [145]-Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1768-72.
- [146]-Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2169-72
- [147]-Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of 3 rapid methods for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin. Microbiol.* 2000; 38:2170-3.]
- [148] -Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin. Microbiol.* 1998; 36:1020-7.
- [149]-Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J Antimicrob. Chemother* 1996; 37: 53-63
- [150]-Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 4:395-400.
- [151]- Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; 13:79-86.
- [152]- Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol.* 2016; 16:115

- [153]-Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2338-41
- [154]- Franklin R. Cockerill III. Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance *Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 1999, Vol. 43, No. 2: 199-212.*
- [155]-Chroma M, Kolar M. Genetic Methods For Detection Of Antibiotic Resistance: Focus On Extended-Spectrum B-Lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010 Dec; 154(4):289-296
- [156]- Luby E, Ibekwe AM, Zilles J, Pruden A. Antibiotics in Agroecosystems: Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *State of the Science. Journal of Environmental Quality, Special Section, 2016; pp 441-453.*
- [157]-SchmidtGV., Folkesson SA, Angen-Olsen JE. (2014). Development of Methods for Genetic Assessment of Antibiotic Resistance In Animal Herds. *Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU).*
- [158]- Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, et al. (2017) Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS ONE* 12(5): e0177627.
- [159]- MeyerF, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M et al. The metagenomics RAST server: A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinf.* 2008;9:386. 8 pages.
- [160]- MarkowitzVM, Chen IMA, Palaniappan K, Chu K, Szeto E. 2012. IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* 2012 ; 40:D115-D122.

- [161]-McArthur AG, Waglehner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:3348–3357.
- [162]-Everley RA, Mott TM, Wyatt SA, Toney DM, Croley TR. Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008 Nov; 19(11):1621–8.
- [163]-Ekström S, Onnerfjord P, Nilsson J, Bengtsson M, Laurell T, Marko-Varga G. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification. *Anal Chem.* 2000 Jan 15; 72(2):286–93]
- [164]-Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics.* 2011 Aug; 11(15):3143–53.
- [165]-Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan; 71(1):58–64
- [166]-Carbonnelle E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X et al. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45: 2156–2161.
- [167]-Croxatto A, Prod'hom G, Greub GFEMS. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Review. *Microbiol Rev.* 2012 Mar; 36(2):380–407
- [168]-Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2011 Jan; 301(1):64–8.

- [169]-Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D .Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak.*J Clin Microbiol.* 2012 Sep; 50(9):2918-31
- [170]-Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry.*Int J Antimicrob Agents.* 2014 Sep; 44(3):256-9
- [171]-Wang LJ, Lu XX, Wu W, Sui WJ, Zhang G. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the screening of vanA-positive *Enterococcus faecium*.*Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2014; 20(6):461-5.
- [172]-Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.*J Clin Microbiol.* 2011 Sep; 49(9):3222-7
- [173]-Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van Belkum A, Goessens WH, Luider TM. Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry.*J Proteome Res.* 2012 Jan 1; 11(1):79-84.
- [174]-Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar; 50(3):927-37

- [175]-Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms.*Proteomics Clin Appl.* 2013 Dec; 7(11-12):767-78.
- [176]-Johansson A, Nagy E, Sóki J, ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections). Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).*Anaerobe.* 2014 Apr; 26():49-52
- [177] -Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM.MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp.*Lett Appl Microbiol.* 2014 Apr; 58(4):325-9
- [178]-Hart PJ, Wey E, McHugh TD, Balakrishnan I, Belgacem O. A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of Escherichia coli using MALDI mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2015 Apr; 111():1-8.
- [179]-Singhal N,Kumar M, Kanaujia PK,VirdiJS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis.*Front Microbiol.* 2015; 6: 791.
- [180]-Lahlou Amine I, Chegri M, L’Kassmi H. Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès. *Antibiotiques (2009) 11, 90—96]*
- [181]-El Bouamri MC, Aarsalane L, Kamouni Y, Berraha M, Zouhair S. Évolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc. *Prog Urol* (2014),

# ANNEXES

## Annexe1 : Tableau 7 les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

| <u>L'antibiotique</u>   |  | <u>Structure chimique</u>   | <u>Spectre d'action</u>   | <u>Indications thérapeutique</u>  | <u>Effets secondaires</u>  | <u>Contre indications</u>  |
|-------------------------|--|---|---|---|--|--|
| <u>Les pénicillines</u> | <u>Pénicillines sensibles aux pénicillinases</u> | L'acide 6-amino pénicillinique est le noyau de base des pénicillines. | <p>Ces antibiotiques se caractérisent par un spectre étroit:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ la pénicilline G couvre</li> <li>- les coques à Gram (+) ou (-)</li> <li>- les bacilles à Gram (+)</li> <li>- les anaérobies</li> <li>- les spirochètes et, à forte dose, - les entérocoques</li> <li>- <i>Listeria</i> et <i>Haemophilus</i></li> <li>▶ la pénicilline V a un spectre plus étroit encore:</li> <li>- coques à Gram (+)</li> <li>- bacilles à Gram (+)</li> <li>- anaérobies</li> <li>▶ La pénicilline G et, dans une moindre mesure, la pénicilline V, restent le traitement de choix des infections à germes Gram (+) non producteurs de <math>\beta</math>-lactamases (<i>streptocoques</i>, <i>Neisseria meningitidis</i>)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- les infections de la sphère ORL (angines à streptocoques)</li> <li>- les pneumonies à pneumocoques ou à germes anaérobies</li> <li>- les méningites à méningocoques ou à pneumocoques</li> <li>-traitement des infections à germes Gram (+) producteurs de <math>\beta</math>-lactamases.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-les réactions précoces (dans les minutes qui suivent l'administration). Elles sont de type anaphylactique et sont liées à la production d'IgE. Elles incluent des manifestations telles que l'érythème, l'urticaire, la rhinite, le bronchospasme, l'hypotension, le choc.</li> <li>-les réactions retardées (dans les heures qui suivent l'administration). Elles résultent de la circulation de complexes immuns mettant en jeu les IgE et de l'activation du complément. Elles produisent des effets du même type, mais ne conduisent pas au</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Les pénicillines sont contre-indiquées en cas d'allergie connue</li> </ul> |

|  |  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
| <p><u>Pénicillines résistantes aux <math>\beta</math>-lactamases</u></p> | <p>-Leur spectre demeure cependant aussi étroit que celui de la pénicilline G.</p>   | <p>-En monothérapie, les pénicillines résistantes aux <math>\beta</math>lactames sont indiqués dans les staphylococcies de la peau, des muqueuses et de la sphère ORL.<br/>-Elles sont également indiquées pour le traitement des staphylococcies plus graves (par exemple, pulmonaires ou ostéo-articulaires), des septicémies et des endocardites, parfois en association avec d'autres antibiotiques (glycopeptide, rifampicine, aminoglycoside)</p> |  |  |
| <p><u>Aminopénicillines</u></p>  | <p>-l'ensemble des germes couverts par la pénicilline G (elles sont même plus actives sur <i>Haemophilus</i>, <i>Listeria</i>, les entérocoques)<br/>- certaines espèces d'entérobactéries (essentiellement sur les espèces <i>Escherichia coli</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> spp)</p> | <p>- les infections ORL à streptocoques<br/>- les infections urinaires ou biliaires à Gram (-) sensibles<br/>- les infections respiratoires, principalement à <i>Haemophilus</i> et à Gram (-), éventuellement en association avec un macrolide ou un aminoglycoside, suivant le germe en cause.<br/>- les méningites (alternative à la pénicilline G)<br/>- les septicémies à germes sensibles (en association avec un aminoglycoside).</p>            |  |  |

|   |   |   |  |  |
|---|---|---|--|--|
| <p><u>Carboxy- et uréido-pénicillines</u></p> | <p>► Leur spectre est réduit du côté des Gram (+), en particulier, vis-à-vis des entérocoques mais élargi du côté des Gram (-).</p>   | <p>En raison de leur large spectre, ces antibiotiques peuvent convenir au traitement des infections sévères à Gram (-), et notamment celles à <i>Pseudomonas</i> (sauf la témocilline). Pour essayer d'obtenir une plus grande efficacité clinique et éviter l'émergence de résistance, on leur associera volontiers un aminoglycoside.</p> |  |  |
| <p><u>Amidimopénicillines</u></p>             | <p>Leur spectre d'action inclut: - les entérobactéries (dont <i>E. coli</i> et <i>Klebsiella</i>)<br/>Elles sont en revanche inactives sur :<br/>- les anaérobies<br/>- les coques<br/>- <i>Haemophilus</i></p> | <p>- Ce spectre assez réduit limite leur usage thérapeutique aux infections urinaires à germes sensibles.</p>   |  |  |

|                                   |                               |   |   |  |   |   |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|---|--|---|---|
| <p><u>Les cephalosporines</u></p> | <p><u>1ere génération</u></p> | <p>Les céphalosporines ont pour noyau commun l'acide 7-amino céphalosporanique.</p>   | <p>► présentent une bonne activité sur les coques à Gram (+), exception faite des entérocoques.<br/>                 ► Elles possèdent une activité limitée sur certaines espèces de bacilles Gram (-) tels que <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.</p>  | <p>-traitement des infections graves à Gram (+) sensibles. --En pratique, les formes à usage oral (céfadroxyl, céfalexine) représenteront des alternatives à l'ampicilline et l'amoxicilline. Les formes à usage parentéral seront souvent limitées à l'usage en prophylaxie</p> | <p>Les céphalosporines peuvent favoriser l'apparition d'une thrombophlébite au site d'injection.<br/>                 Certaines céphalosporines présentent en outre des effets secondaires particuliers:<br/>                 - toxicité rénale pour la céfaloridine<br/>                 - colite pseudomembraneuse par surinfection à <i>Clostridium difficile</i> (surtout pour la céfopérazone).<br/>                 - pour les dérivés porteurs d'un radical N-méthylthiométhyltétrazole (latamoxef, céfamandole, céfopérazone, céfotétan), effet "Antabuse » et hypoprothrombinémie liée soit à une diminution de synthèse de facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, soit à une destruction de la flore intestinale responsable de la synthèse de vitamine K. Ceci proscrit leur utilisation en particulier en prophylaxie chirurgicale ou au décours d'une intervention de chirurgie vasculaire, situations dans lesquelles l'usage d'anticoagulants de type anti vitamine K est fréquemment préconisée.</p> | <p>Mis à part le cas d'allergie, les céphalosporines présentent une très bonne sécurité d'emploi.</p> |
|                                   | <p><u>2eme génération</u></p> | <p>► un spectre élargi vers les bactéries à Gram (-), en particulier <i>Proteus</i> et <i>Enterobacter</i>. Elles sont également bien actives sur <i>Haemophilus influenzae</i> et sur les gonocoques. Enfin, la céfoxitina présente une activité modérée sur les anaérobies, dont <i>Bacteroides fragilis</i>.</p>   | <p>► des otites ou sinusites à <i>Haemophilus</i><br/>                 ► des infections broncho-pulmonaires à Gram (+), <i>Haemophilus</i> ou <i>Klebsiella</i><br/>                 ► des infections urinaires compliquées à entérobactéries<br/>                 ► des infections ostéo-articulaires<br/>                 ► des septicémies (en association à un aminoglycoside).</p>   |  |   |   |
|                                   | <p><u>3eme génération</u></p> | <p>► Certaines céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération sont moins actives que les molécules des générations antérieures sur les Gram (+), notamment les streptocoques et pneumocoques. Par contre, elles sont actives à des concentrations très faibles sur les entérobactéries. De même, elles sont très actives sur <i>Haemophilus</i> et <i>Neisseria</i>. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre dans le spectre de la ceftazidime et de la céfsulodine.</p> | <p>-traitement des infections sévères à Gram (-) et restent en principe actives sur des germes multirésistants.</p>   |  |   |   |
| <p><u>4eme génération</u></p>     |                               | <p>-couvrent les Gram (-), y compris <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, mais aussi les Gram (+).</p>  | <p>une activité sur certaines espèces de germes résistants aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération<br/>                 elles pourraient remplacer les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération pour le traitement des infections à germes résistants.<br/>                 -Leur atout majeur par rapport aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (notamment la ceftazidime) reste cependant leur spectre plus large sur les Gram (+)</p> |  |   |   |

| <u>L'antibiotique</u>   | <u>Structure chimique</u>  | <u>Spectre d'action</u>   | <u>Indications thérapeutique</u>   | <u>Effets secondaires</u>   | <u>Contre indications</u>  |
|-------------------------|--|---|--|---|--|
| <u>Les carbapénèmes</u> | Les carbapénèmes dérivent de la thiénamycine.  | ► Les carbapénèmes présentent des valeurs de CMI très basses vis-à-vis de la majorité des Gram (+), des Gram (-) [à l'exception de certaines espèces spécifiques (par exemple, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )] et des anaérobies, y compris la quasi-totalité des souches productrices de $\beta$ -lactamases. | -infections nosocomiales (surtout poly microbiennes) sévères (infections urinaires, respiratoires, gynécologiques, des articulations et des os).   | -Les effets secondaires les plus courants sont des troubles digestifs (nausées et vomissements). Ils peuvent toutefois être réduits par une perfusion lente.<br>-Des convulsions peuvent aussi être observées chez des patients présentant des lésions au niveau du SNC ou une fonction rénale très déficiente. Cet effet est moins important pour le méropénème (études animales).<br>-Une hypersensibilité doit être redoutée chez les patients allergiques aux autres $\beta$ -lactames (allergie croisée dans 50% des cas). | L'insuffisance rénale justifie un ajustement de la posologie du médicament   |
| <u>monobactames</u>     | Les monobactames sont des $\beta$ -lactames monocycliques.   | ► Les monobactames sont inactifs sur les Gram (+) et les anaérobies. Par contre, ils sont très actifs sur les entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .  | -le traitement des infections graves à Gram (-) chez les patients allergiques aux $\beta$ -lactames ou ne pouvant recevoir d'aminoglycosides (insuffisants rénaux).  | -L'aztréonam présente une bonne sécurité d'emploi. En principe, il n'y pas de résistance croisée avec les autres $\beta$ -lactames.   | -Etant donné que le médicament est éliminé par les reins, un ajustement de la posologie s'impose chez les insuffisants rénaux.                           |
| <u>glycopeptides</u>    | -Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres (mannose et glucosamine dans la teicoplanine; glucose et vancosamine dans la vancomycine). | ► Les glycopeptides ne sont actifs que sur les Gram (+).  | - endocardite et septicémie<br>- infections sévères des tissus mous et ostéoarthrite<br>- méningite (post-neurochirurgicale ou en cas de présence d'un shunt de dérivation ventriculo-péritonéal infecté)<br>- colite pseudo-membraneuse à <i>Clostridium difficile</i> (l'usage oral des glycopeptides est cependant remis en question) | -La vancomycine induit plus fréquemment des effets secondaires que la teicoplanine. Elle est responsable de néphro- ou d'ototoxicité modérée, surtout lorsqu'elle est administrée avec un autre médicament néphro- ou ototoxique respectivement.<br>-Une phlébite au site d'injection est fréquente, ou une hypotension et la libération d'histamine pour la vancomycine uniquement (donnant naissance au syndrome dit de "l'homme rouge") en cas de perfusion trop rapide (< 30 min).  | En cas d'insuffisance rénale, des taux toxiques de vancomycine peuvent facilement être atteints si l'on ne prend pas la précaution de réduire le dosage. |

**Annexe2 :Tableau8 les antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques**

| <u>L'antibiotique</u>  | <u>Structure chimique</u>  | <u>Spectre d'action</u>   | <u>Indications thérapeutiques</u>   | <u>Effets secondaires</u>   | <u>Contre indications</u>   |
|------------------------|--|---|---|---|---|
| <u>Quinolones</u>      | Les fluoroquinolones actuelles dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués.   | Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre.  | traitement des infections ne répondant pas à d'autres antibiotiques ou celles où leurs propriétés pharmacocinétiques sont essentielles, dans la mesure où c'est leur usage large qui favorise le développement des résistances. Ainsi, l'utilisation très répandue de ces antibiotiques dans le traitement des infections banales des voies urinaires devraient être évitées. | Les fluoroquinolones peuvent induire<br>- des troubles digestifs ou hépatiques<br>- une atteinte du système nerveux central<br>- une toxicité rénale<br>- une phototoxicité,<br>En outre, les fluoroquinolones se lient irréversiblement et peuvent causer des altérations au cartilage (arthralgie). | En raison de leur capacité à se lier aux cartilages, les fluoroquinolones sont contre-indiquées chez les femmes enceintes et les enfants.   |
| <u>sulfamidés</u>      | Les sulfamidés sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique,   | Les sulfamidés sont actifs sur la plupart des coques à Gram (+) et (-).   | Le traitement d'infections non compliquées des voies urinaires, des voies respiratoires hautes, ou encore, des voies digestives.  | Les sulfamidés ont pour effet secondaire le plus redoutable l'induction de réactions toxiallergiques  | patients souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique, ou de troubles hématologiques. Elles ne peuvent être administrées pendant la grossesse ou l'allaitement.                                       |
| <u>Nitroimidazolés</u> | l'addition d'un substituant nitro en position 5 confère à ces molécules l'activité antibactérienne ciblée spécifiquement sur les bactéries anaérobies. | -bactéries anaérobies, - quelques espèces microaérophiles, et certains protozoaires anaérobies ( <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Gardia lamblia</i> ). | Les nitro-imidazoles sont indiqués dans le traitement des infections Anaérobies.  | Les nitroimidazoles induisent rarement des troubles neurologiques (paresthésies, neuropathies périphériques, encéphalopathies, crises épileptiques) et des troubles hématologiques (agranulocytose).  | Les nitroimidazoles doivent être évités au cours de l'allaitement, car ils passent dans le lait maternel. Par contre, des études cliniques ont documenté leur sécurité d'emploi pendant la grossesse. |

**Annexe3 : Tableau9 les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique :**

| <u>antibiotique</u>  | <u>Structure chimique</u>  | <u>Spectre d'action</u>  | <u>Indications thérapeutiques</u>   | <u>Effets secondaires</u>   | <u>Contre-indications</u>   |
|----------------------|--|--|---|---|---|
| <u>macrolides</u>    | Les macrolides sont constitués par un macrocycle porteur d'une fonction Lactone.   | Les macrolides ont un spectre orienté principalement vers les Gram (+), cocci ( <i>Staphylococcus</i> et <i>Streptococcus</i> ) et bacilles ( <i>Corynebacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i> ).                                 | traitement de choix des infections pulmonaires atypiques<br>traitement des infections suivantes :<br>- infections respiratoires :<br>- pharyngite à Streptocoques chez les patients allergiques aux $\beta$ -lactames<br>- coqueluche, diphtérie... | les macrolides provoquent régulièrement (surtout l'érythromycine) une intolérance digestive.                          | les macrolides ne peuvent être utilisés chez les insuffisants hépatiques. L'érythromycine est contre-indiquée chez les patients recevant de l'ergotamine, de la digoxine ou de la terféndine. |
| <u>lincosamides</u>  | Les lincosamides, sont constitués d'un acide hygriquealkylé en position 4 et substitué via une fonction amide par un groupement 6-amino-thio-octo-pyrannoside. | Les lincosamides couvrent principalement les Gram (+) et les anaérobies.   | traitement des infections à Gram (+) de l'os, de la peau et des tissus mous.<br>La clindamycine, plus active sur les anaérobies, est préférée pour traiter les abcès.   | Les lincosamides peuvent causer une diarrhée en déséquilibrant la flore intestinale par leur activité anti-anaérobie. | La dose de lincomycine administrée, mais pas celle de clindamycine, doit être réduite chez les insuffisants rénaux.   |
| <u>synergistines</u> | Les synergistines sont des antibiotiques apparentés aux macrolides, qui présentent la particularité d'être formés d'une paire de constituants synergiques.     | - les Gram (+): staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, corynebactéries, <i>Listeria</i><br>- des Gram (-): méningocoques, gonocoques, <i>Legionella</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Haemophilus</i><br>- les mycoplasmes<br>- les anaérobies | -traitement de choix des staphylococcies<br>-traitement des infections à streptocoques.<br>-prophylaxie ou le traitement des infections à germes anaérobies   | Les synergistines sont très bien tolérées. Elles causent rarement des troubles digestifs mineurs.                     |   |
| <u>aminosides</u>    | structure de base commune comporte un aminocyclitol, auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 (ou exceptionnellement 3) oses                              | Les aminoglycosides sont surtout actifs sur les Gram (-), dont les entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | le traitement des infections sévères à Gram (-) en milieu hospitalier. Celles-ci peuvent inclure <i>Pseudomonas</i>   | -un blocage neuro-musculaire lors d'une injection trop rapide<br>-Toxicité rénale<br>-Toxicité auditive               |   |

|                     |   |  |   |  |   |
|---------------------|---|--|---|--|---|
| <u>phénicolés</u>   | Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényle substitué. | <ul style="list-style-type: none"> <li>- les coques à Gram (+) ou (-),</li> <li>- les bacilles à Gram (+),</li> <li>- certains bacilles à Gram (-) dont les entérobactéries,</li> <li>- les anaérobies,</li> <li>- les spirochètes,</li> <li>- certains germes particuliers comme les <i>Rickettsia</i>, <i>Chlamydia</i> et Mycoplasmes.</li> </ul> | -méningites, abcès cérébraux (usage exceptionnel, l- fièvre typhoïde ( <i>Salmonella thyphi</i> ) non sensible à d'autres antibiotiques   | -une myélosuppression réversible qui ne touche généralement qu'une seule lignée cellulaire.<br>-anémie aplastique irréversible.<br>-une anémie hémolytique | Les phénicolés sont contre-indiqués chez tout patient présentant des antécédents d'insuffisance médullaire.   |
| <u>tétracycline</u> | Les tétracyclines doivent leur nom à leur structure tétracyclique commun.                           | Les tétracyclines sont donc actives vis-à-vis des coques et bacilles à Gram (+), des coques et bacilles à Gram (-), y compris des germes intracellulaires, ainsi que des anaérobies.   | infections à <i>Chlamydia</i> , <i>Rickettsia</i> , Mycoplasmes, <i>Brucella</i> , les infections cutanées à <i>Propionibacterium</i> et <i>Borrelia</i> , ou comme alternative aux infections à <i>Neisseria</i> , au traitement des pneumonies atypiques, de la syphilis et des amibiases | Les tétracyclines et la tigécycline sont généralement bien tolérées mais elles peuvent induire des effets secondaires non négligeables.                    | -enfants de moins de 7 ans, femmes enceintes.<br>-La prudence s'impose chez les patients souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique et chez les patients dont les activités impliquent une exposition intense à la lumière. |