

INTRODUCTION

Les bacilles à Gram négatif représentent un groupe bactérien hétérogène qui comprend les Entérobactéries et d'autres genres comme *pseudomonas*. Les infections dues aux bacilles à Gram négatif sont devenues de plus en plus fréquentes surtout en milieu hospitalier. Ceci amène à discuter les causes de cette recrudescence et les solutions à y apporter.

Certains bacilles à Gram négatif peuvent devenir très résistant aux antibiotiques d'où la nécessité de connaître leur sensibilité à ces antibiotiques.

Sa résistance bactérienne est un facteur compliquant la chimiothérapie antibactérienne. Le contrôle des maladies infectieuses et de la dissémination de souches multirésistantes .

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis , son mécanisme et son support génétique.

En dépit de leur diversité, les bactéries possèdent un nombre limité de mécanismes de résistance.

Cependant de nouveaux mécanismes de résistance apparaissent en réponse à l'utilisation de nouvelles molécules.

Première partie : GENERALITES

I / Définition d'un Bacille Gram Négatif producteur de bêtalactamases à spectre élargi

Sont considérées comme potentielles productrices de bêtalactamases à spectre élargi toutes les souches présentant des CMI élevées à la céfotaxime ($\geq 2\mu\text{g/ml}$) .

Si la souche produit une bêtalactamase à spectre élargi, il y a une augmentation très nette ($\geq 4\text{mm}$) ou une distorsion de la zone d'inhibition autour d'un disque contenant l'oxy-imino bêta-lactamine, et ceux en regard du disque contenant l'acide clavulanique.

II / Taxonomie des bacilles à Gram négatif responsables d'infections nosocomiales

II-1 *Enterobacteriaceae*

II-1-1 *Escherichia coli*

C'est l'espèce la plus sensible .

Depuis une vingtaine d'années on assiste à une augmentation de souches productrices de céphalosporinases conduisant à une diminution de la sensibilité aux céphalosporines de première génération et aux aminopénicillines.

0,5 % des souches produisant des bêtalactamases à spectre élargi à toutes les bêtalactamines à l'exception de céphamycines et Imipénème.

II-1-2 *Klebsiella pneumoniae*

La mise en évidence de souches reproductrices de bêta-lactamases à spectre élargi aux céphalosporines de troisième génération (C3G) date des années 1980.

Les premières souches ont été observées en Allemagne en 1983, en Tunisie en 1984 et en France en 1985, (Référence).

Parmi les souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi, *K. pneumoniae* représente (83%), suivi par *E. coli* (8%), *Salmonella* (3%), *Enterobacter cloaccae* et *Enterobacter aerogenes* (2,5%).

II-1-3 *Proteus*

P. mirabilis est l'espèce la plus fréquemment isolée ; en particulier des urines.

Elle est très sensible aux antibiotiques.

II-1-4 *Enterobacter cloaccae*

Ils sont isolés en milieu hospitalier et représentent 10 à 15% de l'ensemble des Enterobactéries isolées dans les hôpitaux parisiens (Référence).

Ce sont des commensaux responsables d'infection nosocomiales en particulier les septicémies (Référence)

2,5% des souches sont productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (Référence).

II-1-5 *Serratia marcescens*

Le genre *Serratia* est reconnu pathogène opportuniste depuis 1959. Il est fréquemment isolé dans les hôpitaux depuis une trentaine d'années avec une incidence élevée dans les services de chirurgie(Référence). 1% des souches possèdent une bêtalactamases à spectre élargi.

II-2 Bacilles à Gram négatif aérobies strictes

II-2-1 *Pseudomonas aeruginosa*

Il est responsable de 10% de l'ensemble des infections nosocomiales. *Pseudomonas* est à l'origine d'infections hospitalières graves survenues chez les immunodéprimés, les brûlés etc.. La mortalité due à *Pseudomonas* est estimée à 70% dans les pneumopathies nosocomiales et 80% dans les septicémies. *P. aeruginosa* représente 91,5% de l'ensemble des infections nosocomiales dues au groupe *Pseudomonas*. 5 à 10% des souches produisent des bêtalactamases à spectre élargi.

II-2-2 *Acinetobacter baumannii*

Il est reconnu comme agent d'infections nosocomiales. Une enzyme proche des bêtalactamases à spectre élargi isolées chez les Entérobactéries a été décrite chez *A. baumannii* (Référence).

III / Traitement des infections à bacilles Gram négatif

La prise en charge des infections bactériennes repose sur l'utilisation d'antibiotiques.

III-1 / Les antibiotiques

III-1-1 Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou hémisynthétiques élaborées par des micro-organismes et qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des bactéries en les détruisant ou en inhibant leur multiplication.

III-1-2 Classification

III-1-2-1 Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent la plus vaste et la plus prolifique famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique. Ces dernières années, la famille des

β -lactamines s'est enrichie de nombreuses molécules particulièrement dans le groupe des céphalosporines. Cette croissance exponentielle constitue, avec la structure spéciale des molécules de β -lactamines, une des caractéristiques de ces antibiotiques.

a- Caractéristiques des β -lactamines

b-

Les β -lactamines sont caractérisées par leur structure et leur mécanisme d'action.

a-1 Structure (figures 1 & 2)

Les β -lactamines ont en commun le cycle β -lactame, support de l'activité anti-bactérienne dont l'ouverture conduit à des produits inactifs.

Les molécules de β -lactamines diffèrent, dans le cas des dérivés classiques, par la chaîne latérale substituant : l'acide 6-amino-pénicillanique (**6 A.P.A.**) dans le cas des pénicillines et l'acide 7-amino-céphalosporanique (**7 A.C.A**) pour les céphalosporines.

Il existe des dérivés dits « non classiques » ayant un noyau central modifié mais possédant une structure apparentée (**17, 80**).

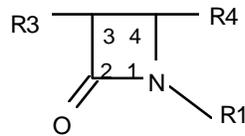
a-2 Mécanisme d'action des β -lactamines

Les β -lactamines appartiennent au groupe des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne . Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse du peptidoglycane ou mureïne, constituant de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif en inhibant la transpeptidase qui joue le rôle de régulateur dans la synthèse de celle-ci (**15**).

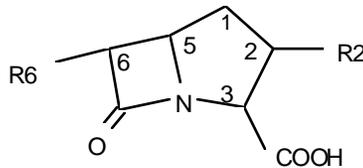
L'action des β -lactamines est liée à la structure de la paroi bactérienne.

En règle générale, la paroi des bactéries à Gram positif se laisse pénétrer sans difficulté par les β -lactamines, car le peptidoglycane ne s'oppose pas au passage des molécules d'aussi petite taille.

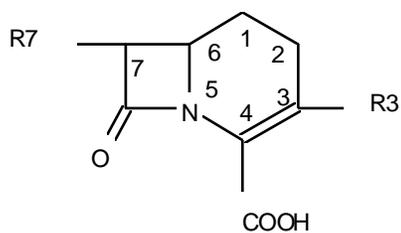
Cette règle ne s'applique pas aux bactéries à Gram négatif à cause de la structure particulière de la paroi de ces bactéries qui ne laissent passer les β -lactamines qu'à travers les porines. Les porines sont des protéines transmembranaires ayant la faculté de se regrouper pour former des canaux, des pores remplis d'eau, permettant ainsi la diffusion à travers la membrane de différents solutés hydrophiles.



Cycle β -lactame

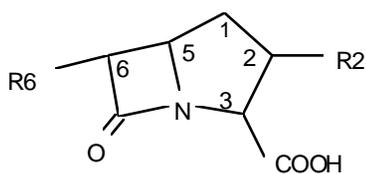


Acide 6-aminopénicillanique (6 A.P.A.)

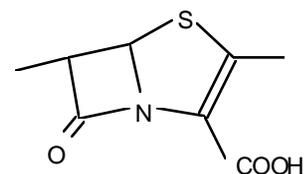


Acide 7-aminocéphalosporanique (7 A.C.A.)

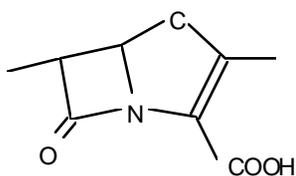
Figure 1 : Structure du cycle β -lactame et des dérivés aminés des β -lactamines



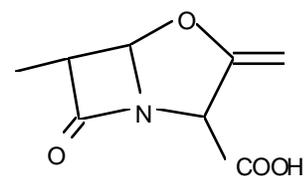
pénams



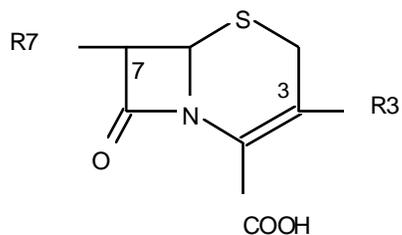
pénems.



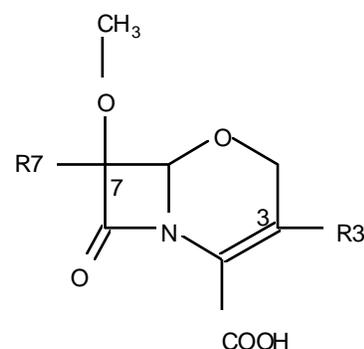
carbapénems.



oxapénams.



céphems.



oxacéphems.

Figure 2 : Structure des différentes β -lactamines

Différents facteurs physico-chimiques peuvent influencer la pénétration des

β -lactamines à travers la paroi bactérienne :

- l'hydrophobicité de la molécule,
- la taille de la molécule
- la charge : les composés zwitterioniques (à double

charge, négative et positive : céfépime et imipénème) diffusent beaucoup plus rapidement à travers les porines que les composés ayant une charge négative unique : céfalotine, céfuroxime céfotaxime, ureïdopénicillines. Une charge négative nette

(soit une charge négative unique soit deux charges négatives et une charge positive) ralentit plus fortement la diffusion à travers les porines OmpC qu'à travers OmpF.

Cependant les propriétés énoncées ci-dessus n'ont qu'une faible incidence sur la diffusion des β -lactamines à travers les porines de *P. aeruginosa*.

c- Classification des β -lactamines

Cette famille comprend trois grands groupes selon l'ancienne nomenclature :

- les pénicillines,
- les céphalosporines,
- les monobactames.

Selon la structure des β -lactamines on peut distinguer les :

b-1 Dérivés de l'acide 7-aminocéphalosporanique :

on distingue : les Céphalosporines, les Céfamycines et les oxacéphems.

Les céphalosporines peuvent être classées de plusieurs manières (16) :

- *classification de Wise*
- *classification de O'Callaghan*
- *classification en générations*

Cette dernière est la plus courante : ainsi on distingue ;

- les céphalosporines de **1^{ère} génération** : Céphalotine, Céfaloridine, Céfacatril, Céfazline...
- les céphalosporines de **2^{ème} génération** : Céfuroxime, Céfamandole, Céfoxitine, Céforanide...
- les céphalosporines de **3^{ème} génération** : Céfotaxime, ceftriaxone, Ceftazidime, Céfopérazone, Cefsulodine, Latamoxef...

On a décrit récemment les 7-méthoxyimino cephèmes zwitterioniques ou céphalosporines de **4^{ème} génération (60)**.

b-2 Les dérivés de l'acide 6-Aminopénicillanique

- Les pénames ou pénicillines,
- Les pénems,
- Les carbapénems,
- Les clavams

b-3 Les Monobactams

La nouvelle nomenclature inclut dans les pénams :

- les ureïdopénicillines (Mezlocilline, Azlocilline, Pipéracilline, Apalcilline) ;
- le sulbactam ;
- la témocilline

III-2. RESISTANCE BACTERIENNE AUX β -LACTAMINES

III.2.1. Notion de résistance

Pour chaque antibiotique est défini un spectre d'activité c'est-à-dire l'éventail des espèces bactériennes "**sensibles**", susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique (surtout *in vivo* après utilisation d'une posologie standard).

Une espèce non sensible, qui n'entre pas dans le spectre d'activité d'un antibiotique, est dite résistante.

Cette résistance est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie.

Plusieurs définitions de la résistance des bactéries aux antibiotiques ont été retenues. Selon certains auteurs :

- une souche est dite “**résistante**” lorsqu’elle supporte une concentration d’antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce **(46)**.

- une souche est dite **résistante** lorsque la concentration d’antibiotique qu’elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte in vivo **(46)**.

- une bactérie **résiste** à un antibiotique lorsqu’une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d’une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique **(21)**.

Il existe plusieurs types de résistances bactériennes aux antibiotiques

III.2.2. Types de résistance

a. Résistance naturelle

b.

La résistance naturelle ou “intrinsèque” correspond à la résistance de toutes les souches d’une même espèce ou d’un même genre bactérien à un antibiotique **(66)**. Le mécanisme de cette résistance est variable mais son support génétique est généralement chromosomique. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l’espèce.

On peut citer les résistances naturelles des *Staphylococcus aureus* et Entérobactéries aux β -lactamines (Pénicilline G, Ampicilline et Cephalosporines), des *Streptococcus sp.* aux aminosides, des *Proteus mirabilis* aux tétracyclines.

c. **Résistance acquise**

d.

La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance à un antibiotique par une souche normalement sensible. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible, à l'inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l'espèce (**22**).

La résistance acquise est évolutive, elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie), de l'utilisation des antibiotiques.

L'acquisition de la résistance peut être liée à un **apport plasmidique** ou à une **mutation chromosomique**.

Cette résistance acquise observée *in vitro et in vivo* pour la plupart des bactéries et des antibiotiques rend nécessaire l'étude de la sensibilité des bactéries au laboratoire.

c. **Résistance clinique**

Elle se traduit par l'échec thérapeutique. Plusieurs facteurs entrent en cause dans ce type de résistance :

- facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices, etc...),
- la pharmacocinétique,
- le choix judicieux de l'antibiotique,
- les mécanismes développés par les bactéries.
-

III.2. 3. **Support génétique de la résistance**

La cellule bactérienne contient un matériel génétique double :

- un **chromosome**, représentant le noyau de la cellule bactérienne, il est indispensable à la vie de la bactérie. Ce chromosome est constitué par un long filament d'ADN pelotonné et qui porte un grand nombre d'informations génétiques,

- la bactérie peut contenir, dans son cytoplasme, un ou plusieurs **plasmides**. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires, extrachromosomiques, douées de réplication autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations. En général, les plasmides naturels des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie hôte (**46**).

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques est fonction d'une information portée par le code génétique.

La résistance peut être codée:

- par le chromosome bactérien ; elle est dite chromosomique

- ou par le plasmide ; elle est dite plasmidique (**1**).

a. Résistance chromosomique par mutation

L'acquisition de la résistance est due à la mutation d'un gène chromosomique

La mutation correspond à une addition, une délétion ou une substitution de bases dont la conséquence est une erreur de lecture du code génétique. Cette modification entraîne une résistance en :

- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- rendant les cibles pariétales (protéines de liaison à la pénicilline par exemple) ou intracellulaires (ADN gyrase, ARN polymérase,

ribosomes), spécifiques de ces antibiotiques, indifférentes à la présence du ou des antibiotiques.

- codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes. La mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci. Ce type de résistance est un phénomène :
- spontané
- rare (la fréquence des mutants dans une population donnée est de 10^{-6} à 10^{-9})
- indépendant de l'antibiotique qui n'agit qu'en tant qu'agent sélecteur en éliminant les populations sensibles
- spécifique
- héréditaire et stable (les fréquences de réversion sont équivalentes à celles des mutations) mais non transmissibles en dehors de la progénie.

b. Résistance par acquisition de gène

L'acquisition d'une information génétique sous forme de plasmide entraîne la synthèse de protéines nouvelles par la bactérie réceptrice. Celle-ci initialement sensible devient résistante à un ou plusieurs antibiotiques. La résistance peut alors être due à :

- l'altération de la cible de l'antibiotique
- la modification du transport de l'antibiotique (diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif)
- l'inactivation de l'antibiotique et
- la substitution de la cible de l'antibiotique.

Les plasmides de résistance peuvent se retrouver au niveau du génome bactérien. A l'inverse on peut retrouver des transposons, initialement localisés au niveau du chromosome, sur des plasmides :

exemple 1 ; gène codant pour la résistance des *S. aureus* à la méticilline (14).

exemple 2.; gène codant pour la pénicillinase SHV-1, d'abord naturellement trouvé sur le chromosome de *Klebsiella pneumoniae* et retrouvé ensuite sur des plasmides chez des espèces variées d'Entérobactéries (61).

c. Résistance par dérèpression de gène

Le patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques (β -lactamines, quinolones, etc...) (64,69).

Ce gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur en amont. Une mutation du gène réprimé ou l'action inductrice de certains antibiotiques (β -lactamines) peuvent entraîner une dérèpression de ce gène de résistance et vont entraîner la sélection de souches résistantes aux molécules concernées.

Ce type de résistance est stable si une mutation est en cause, mais il régressera avec retour au phénotype initial à l'arrêt de l'antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.

III.2.4. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

(figure 3)

Les β -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.

Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur les protéines de liaison à la pénicilline (**PLP**) qui sont en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux β -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle β -lactame.
- la modification de l'affinité des **PLP** pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente **(12) (Tableau I)**.

a. Résistance par production d'enzymes

(3, 7, 11, 23, 19, 68, 74)

La production d'enzymes capables d'inactiver les β -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de β -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes **(46)**.

a.1. les β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle β -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*E. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme β -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *S aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des β -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des β -lactamases ont été proposées (7, 20, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats (β -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de **RICHMOND** et **SYKES** (**tableau II**) (15).

Le **tableau III** reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les β -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les *Haemophilus*, les *Neisseria*, les *Pasterella*, les *Pseudomonas*. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

Pseudomonas aeruginosa produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des β -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (**40, 81**) : ce sont les β -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés

proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux β -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (**75**).

Ces β -lactamases sont

retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*) (**8, 62, 74**).

Récemment sont apparues :

- des β -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.
- de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou

β -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (**45, 47**). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "**céphalosporinases bas niveau**" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "**céphalosporinases haut niveau**" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les β -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines entérobactéries (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas* où ce mécanisme

Pour que la bactérie puisse produire des β -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une β -lactamine (48).

Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des β -lactamines

(acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (25).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E.cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

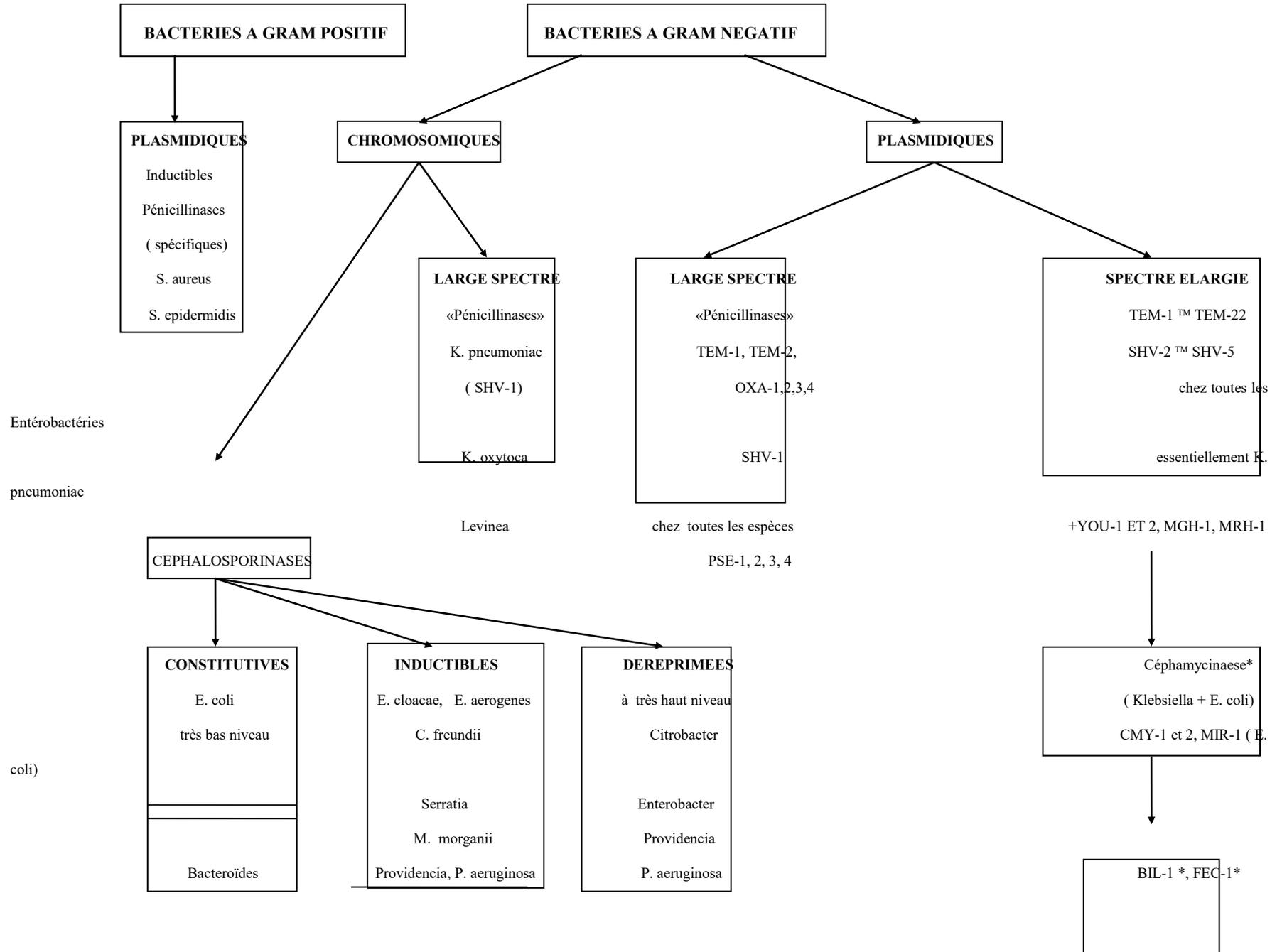
Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux β -lactamines

Mécanismes	Bactéries à Gram Positif	Bactéries à Gram négatif
Production d'une β -lactamase	+	+++
Imperméabilité de la paroi	-	++
Modification des PLP	+++	+

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des β -lactamases des bactéries à gram négatif

Médiation	Type	Classe	Inductibilité	Activité préférentielle		Inhibée par		Principaux germes
				Péni	CSP	Cloxa	PCMB	
Chr	Case	Ia	I	-	+++	S	R	Entérobacter Citrobacter
Chr	Case	Ib	C	-	+	S	R	E. coli
Chr	Case	Ic	I	-	++	S	R	Proteus vulgaris
Chr	Case	Id	I	-	+	S	R	P. aeruginosa
Chr	Pase	II	C	++	-	S	R	Proteus mirabilis
Pl	Case	III	C	+++	+	S	R	Médiation plasmidique type TEM
Chr	Case	IV	C	+	+	R	S	Klebsiella species
Pl	Pase	V	C	++	-	R	S	Médiation plasmidique type OXA, PSE

Tableau III : Classification des β-lactamases



(Cefuroximes)

P. vulgaris

Serratia

*non dérivés de TEM

MEN-1*

(*E. coli*)

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que :

E. cloacae, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia sp*, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de β -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de β -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

a.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

a.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des β -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

b. Résistance non enzymatiques aux β -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux β -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de β -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

b.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique **(33)**.

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les β -lactamines est corrélée à la CMI **(38)**.

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés **(Tableau IV)**.

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les β -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les β -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.**(87)**

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les β -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline **(33, 37)**.

La résistance aux β -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les β -lactamines.

b.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux β -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif.

b.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux β -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des β -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (57).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles.

C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les β -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC⁻, la pénétration des β -lactamines n'est pas diminuée car le

diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

Tableau IV : Résistances liées à des modifications de **PLP** chez des bactéries à Gram positif

	Espèce
Diminution d'affinité pour les β -lactamines	<i>C. perfringens</i> <i>S. pyogenes</i>
Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	<i>Entérocoques</i>
Acquisition d'une nouvelle PLP	<i>S. aureus</i>
Multiples modifications	<i>S.pneumoniae</i>

Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	- <i>Entérobactéries (E. coli, P. mirabilis, K. pneumoniae, E. cloacae, Salmonella, Serratia)</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Haemophilus</i> - <i>Gonocoque</i>
Modification des PLP	- <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Haemophilus</i> - <i>Gonocoque</i>
Modification du LPS	- <i>Pseudomonas</i>

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des β -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC⁻OmpF⁻, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération **(26,64)** avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les *Klebsielles*, les *Serratia* et les *Enterobacter* **(35, 36, 57, 64, 72, 77)**.

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres β -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

b.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux β -lactamines

L'efficacité des β -lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP.

La liaison antibiotique / cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif **(24, 50, 77)**

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *E coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations

touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (77).

b.2.3 Autres mécanismes de résistance aux β -lactamines

- Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux β -lactamines(34).

- Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une

augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de

l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les β -lactamines vis-à-vis des Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique.

Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien.

Ce phénomène a été observé avec les β -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

Deuxième partie : TRAVAIL PERSONNEL

I/ cadre d'étude

Service de Bactériologie Virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec

II / Matériels et méthodes

A/ Souches bactériennes

A-1 Souches étudiées

L'étude a été menée sur un total de 278 bacilles à Gram négatif sur une période allant de Janvier 96 à Décembre 97. Les espèces concernées sont :

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus Indol +*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Ces souches ont été isolées des produits pathologiques suivants :

- urines
- sang
- pus
- liquide céphalo-rachidien (LCR)
- expectorations
- prélèvements ORL

Toutes les souches testées ont été conservées à -70°C dans des cryotubes (NUNC®) contenant du Bouillon Cœur-Cervelle (BCC)

additionné de 15% de glycérol en trois exemplaires sur trois portoirs différents.

A-2 Souches de référence

L'utilisation des souches de référence permet de vérifier la conformité des résultats du test.

Les souches de référence recommandées par le fabricant (AB Biodisk, Sölna, Sweden) sont les suivantes :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

B / Test de sensibilité

On utilise la méthode E-test® en suivant les recommandations du fabricant (AB Biodisk Sölna Sweden).

Les antibiotiques testés sont :

- Amoxicilline (AC)
- Amoxicilline + Acide clavulanique (XL)
- Piperacilline (PP)
- Ticarcilline (TI)
- Ticarcilline + Acide clavulanique (TIC)
- Céfalotine (CE)
- Cefoxitine (FX)
- Cefotaxime (CT)
- Ceftazidime (TZ)
- Cefepime (PM)
- Imipeneme (IP)
- Aztréonam (AZ)

- Gentamicine (GM)
- Amikacine (AK)
- Ciprofloxacine (CI)
- Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (TS)

L'interprétation utilise les recommandations du NCCLS et les indications de M100- S7

B-1 Méthode E-test®

B-1-1 Matériels et réactifs

- ◆ Matériel pour le E-test®
 - Bandes de E-test®
 - Applicateurs de E-test®
 - Paquet d'insertion des bandes
 - Boîtes de pétri de 150mm et 90mm de diamètre
 - Paire de ciseaux
 - Ecouillons stériles
 - Tubes à essai stériles
 - Spectrophotomètre
 - Guide technique pour E-test®
 - Normes NCCLS et indication M100-S7
- ◆ Réactifs
 - eau physiologique
 - milieu de Müller Hinton
 - échelle Mc Farland (0,5)

B-1-2 Matériel pour la conservation

- cryotubes type NUNC® pour la conservation
- BBC additionné de 15% de glycérol
- Lait écrémé à 10%
- Sérum de veau foetal
- Gélose au sang cuit en boîte ou en tube avec pente

B-1-3 Matériel pour l'analyse des résultats

L'analyse des résultats a été effectuée par le logiciel **WHONET IV**

Le **WHONET** est une série de programmes informatiques qui facilite la gestion des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de germes bactériens. Des programmes d'analyse utilisant ces données aident à la meilleure compréhension de l'épidémiologie des résistances aux antibiotiques et le développement de pratiques de prescription rationnelles et de procédures de contrôle des infections. Ces données pourront être employées à un niveau local et pourront aider les laboratoires dans la sélection des antibiotiques en reconnaissant et en soulevant des problèmes de résistance au plan local et en identifiant des problèmes de contrôle de qualité.

Le but du programme **WHONET** est l'établissement de réseaux nationaux et internationaux de surveillance continue de la résistance sur une échelle assez large.

B-1-4 Méthode détermination de la sensibilité par E-test

- a) - Sortir les paquets de bandes et les tubes de rangement du freezer (-20°C) et laisser les bandes à la température ambiante,
- b) - Lire la notice intérieure,

B-1-4-1 Préparation de l'inoculum

- a) - Utiliser des colonies viables pour préparer l'inoculum,
- b) - Homogénéiser individuellement les colonies viables de 24 à 48 heures dans une solution convenable de NaCl à 8,5 g%
- c) - Ajuster la turbidité de la suspension à 0,5 Mc Farland en déterminant la D.O. au spectrophotomètre comparativement à celle du témoin.

B-1-4-2 Inoculation

La méthode d'ensemencement du milieu préconisée par le NCCLS est la méthode par écouvillonnage ou méthode **KIRBY - BAUER**.

Ensemencer sur des boîtes de pétri contenant de la gélose d'une épaisseur de 4 ± 0.5 mm.

S'assurer que la surface gélose est bien sèche avant de procéder à l'écouvillonnage.

Plonger un écouvillon dans l'inoculum, bien essorer l'écouvillon sur les bords du tube, écouvillonner entièrement la surface de la gélose dans trois directions différentes .

Laisser sécher à la température ambiante environ une quinzaine de minutes.

B-1-4-3 Application des bandes

Il faut s'assurer que la surface de la gélose ensemencer est entièrement sèche.

Avec l'applicateur, déposer la bande de E-test sur la gélose.

Il faut toujours appliquer la bande en mettant l'échelle de la CMI face à l'ouverture de la boîte. Il ne faut pas la mettre à l'envers.

Assurer un bon contact entre la bande et la gélose en appuyant sur la bande en partant de la base.

Il ne faut jamais déplacer la bande après application, car l'antibiotique diffuse immédiatement après contact dans la gélose.

B-1-4-4 Incubation

Le temps et l'atmosphère d'incubation dépendent du germe à tester (**Annexe II**).

B-1-4-5 Lecture

les boîtes sont lues après la période d'incubation recommandée, à condition d'avoir une croissance significative à la surface de la gélose et que l'ellipse d'inhibition soit clairement visible. (**figure 6**)

La C.M.I. est lue au point d'intersection de l'ellipse et de la bande (**figure 5**).

La lecture ne présente pas de difficulté lorsque la zone d'inhibition est parfaitement définie et symétrique. Dans les autres cas, une interprétation est nécessaire :

- l'observation d'un décrochage ou "**dip**" dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse (**figure 7**).

- la présence de colonies "**squatter**" doit être analysée ; il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou de mélanges bactériens (**figure 8**).

- l'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de la CMI et ne doit pas interférer avec la lecture (**figure 9**).

- la présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a pas de signification bactériologique et est certainement due à gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette (**figure 10**).

- les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques ; la CMI correspond à la concentration la plus haute lue sur la règle (**figure 11**).

Dans tous les cas les souches de référence doivent être étudiées en parallèle comme contrôle de qualité afin de valider le test et aussi d'éviter les erreurs. Il faut lire en premier les résultats des souches de référence

B-1-4-6 Contrôle de qualité

Outre l'utilisation des souches de référence pour valider le test, les contrôles de qualité doivent s'effectuer à tous les niveaux :

- Les souches de référence

Un certain nombre de règles doivent être respectées ;

- * utiliser des souches de référence sûres type ATCC
- * entretenir correctement les souches de contrôle de qualité ; pour cela les conserver selon deux méthodes, soit en stock de culture pour l'utilisation fréquente des souches, soit à -70°C dans des cryotubes pour une conservation longue durée. Quarante exemplaires sont établis pour chaque souche de contrôle répartis sur deux portoirs différents, conservés à -70°C (freezer).

- Milieux et réactifs

Pour assurer une bonne qualité des résultats il faut :

- * vérifier les dates de péremption des milieux et réactifs.
- * un stockage correcte des milieux de culture, des bandes de Etest avec un relevé quotidien de la température du freezer et du frigo.
- * une manipulation correcte avec respect de la démarche du protocole établi.
- * une sélection correcte de la terminaison en pointe de la CMI.
- * un contrôle de la gélose, c' est à dire ;

** de la profondeur.

** de la capacité de croissance supportée.

** de la présence d'antagonistes tels la thymidine
la thymine et des ions.

C/ Méthode de détection des bêta-lactamases

On utilise la méthode E-test® en se basant sur la CMI à la cefotaxime qui doit être supérieure ou égale à 2µg par ml pour que la souche soit considérée comme productrice de bêta-lactamases.

RESULTATS

Notre étude a été menée sur un total de 278 souches de bacilles à Gram négatif provenant de divers prélèvements.

Différentes familles d'antibiotiques ont été testées sur ces souches.

La recherche de bêtalactamases a été effectuée conjointement au test de sensibilité en se basant sur la CMI à la céfotaxime de toutes les souches à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

I/ Distribution des 278 bacilles à Gram négatif responsables d'infections nosocomiales.

Tableau I

Espèces bactériennes	Effectif	Pourcentage (%)
<i>Escherichia coli</i>	110	39,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80	28,8
<i>Proteus mirabilis</i>	18	6,5
<i>Proteus indol</i> +	10	3,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	21,6
Total	278	100

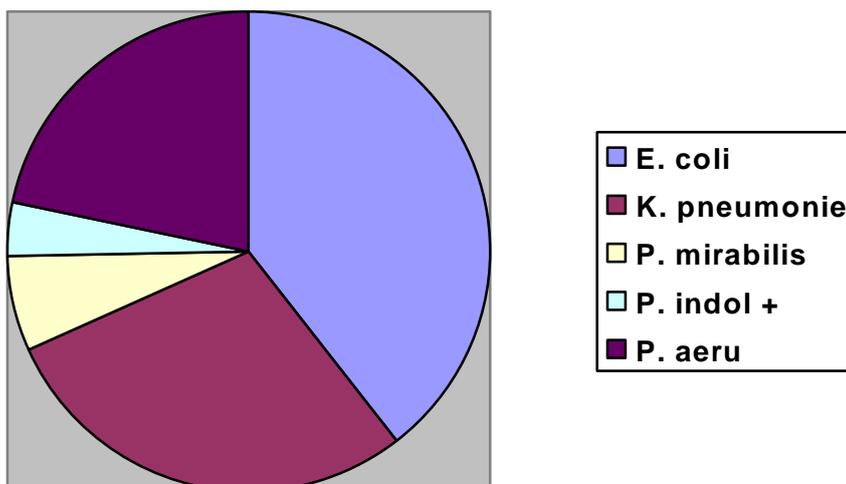


Figure 1 : Diagramme en disque

On constate, selon les résultats obtenus, que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus en cause dans les infections nosocomiales.

II / Répartition des souches en fonction des produits pathologiques

Tableau II

Espèces bactériennes	Produits pathologiques					TOTAL
	Urines	Pus	Sang	expectorations	LCR	
<i>Eschericia coli</i>	26	66	16	1	1	110
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	42	19	3	-	80
<i>Proteus mirabilis</i>	3	12	2	-	1	18
<i>Proteus indol +</i>	1	7	2	-	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	42	5	1	-	60
Total	58	169	44	5	2	278

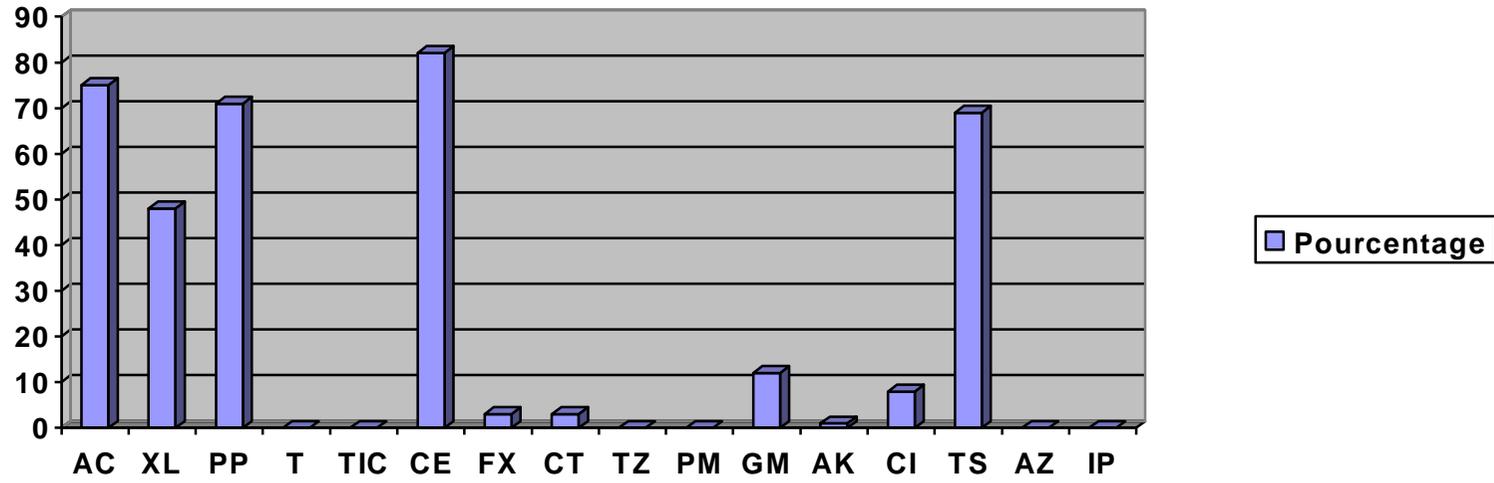
III / Profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif étudiés aux différents antibiotiques testés

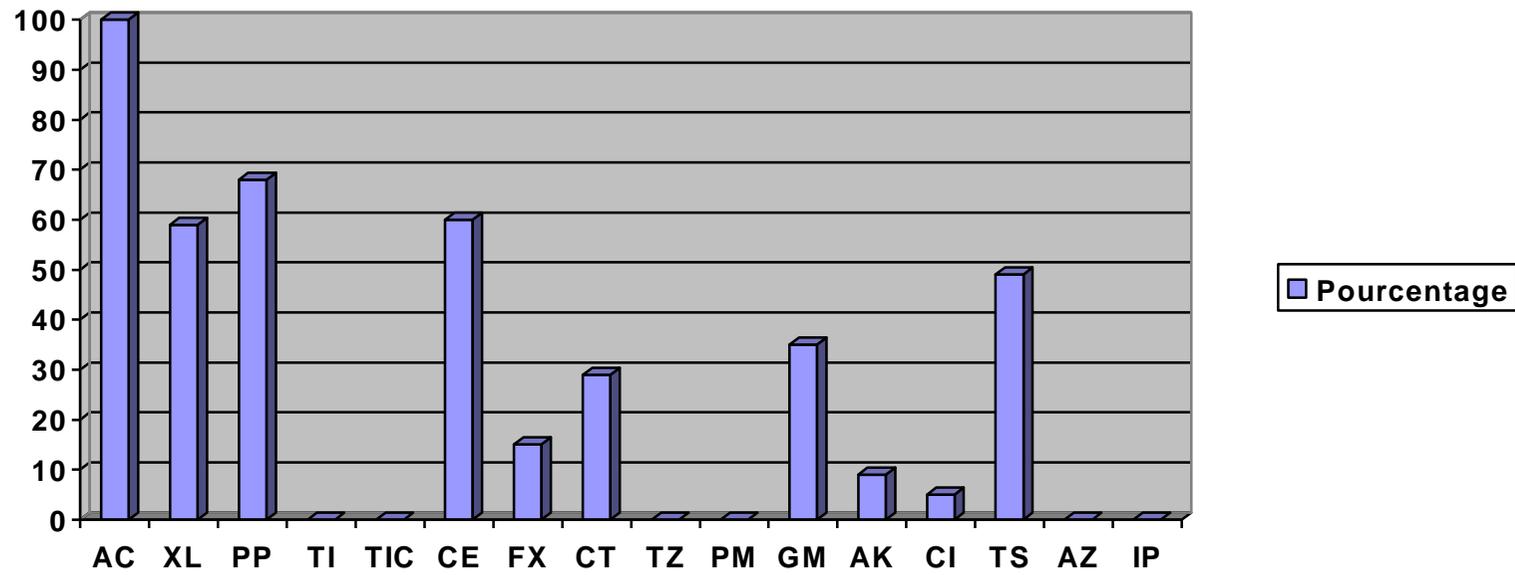
Tableau III : Inhibition par les antibiotiques des 278 bacilles à Gram négatif étudiés (CMI50/90 en µg /ml). En paysage

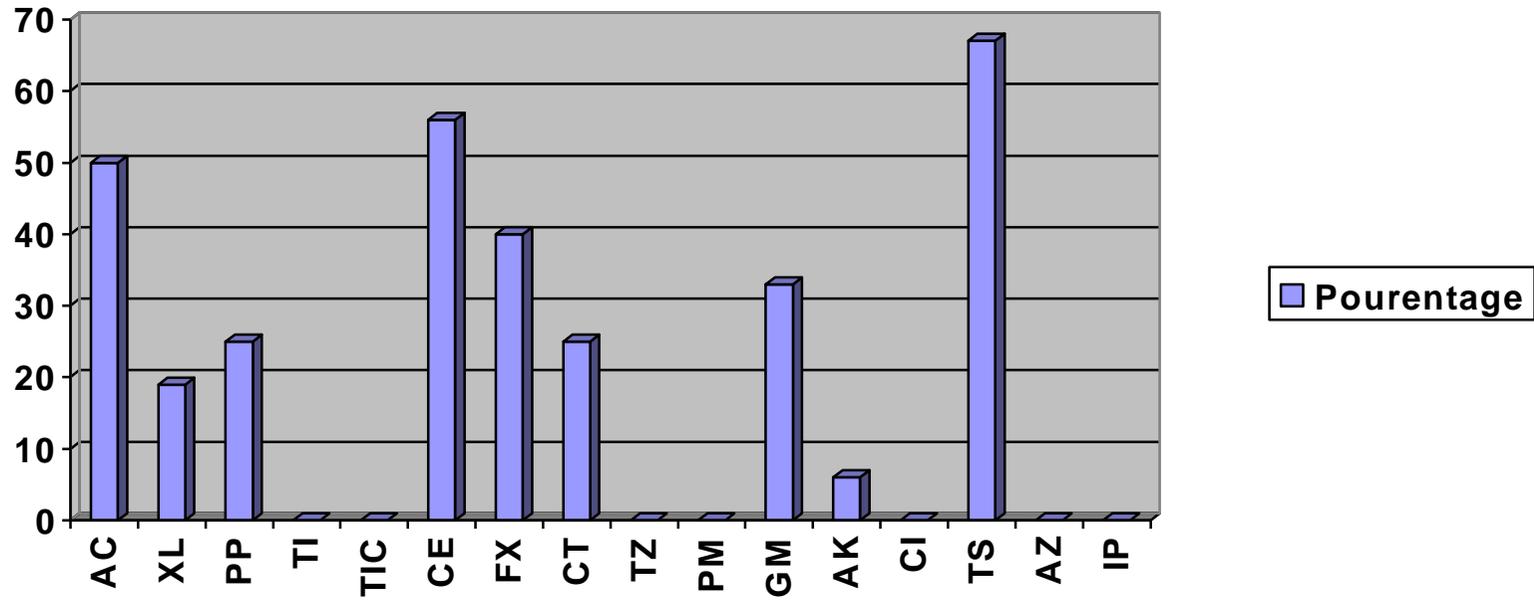
Antibiotiques		Activités contre :			
Code	Nom	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. indo</i>
AC	Amoxicilline	> 256 / > 256	> 256 / >256	256 / 256	> 256 /
XL	Amoxicilline + Acide clavulanique	8 / 32	4 / 32	9 / 16	> 256 /
PP	Piperacilline	> 256 / >256	64 / > 256	2 / > 256	> 256 /
TI	Ticarcilline				
TIC	Ticarcilline + Acide clavuniqu				
CE	Céphalothine	32 / > 256	16 / > 256	8 / > 256	> 256 /
FX	Céfoxitine	2 / 8	4 / > 128	4 / 32	4 /
CT	Céfotaxime	0,064 / 25	0,032 / 32	1 / 32	4 / >
TZ	Ceftazidime				
PM	Céfépime				
GM	Gentamicine	1 / 4	4 / 64	2 / 32	2 /
AK	Amikacine	2 / 4	2 / 16	2 / 4	2 /
CI	Ciprofloxacine	0,032 / 125	0,064 / 4	0,064 / 5	0,064
TS	Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	> 32 / > 32	> 32 / > 32	> 32 / > 32	> 32 /
AZ	Aztréonam				
IP	Imipénème				

Tableau IV : Profil de sensibilité des bacilles à Gram négatif étudiés aux différents antibiotiques testés.

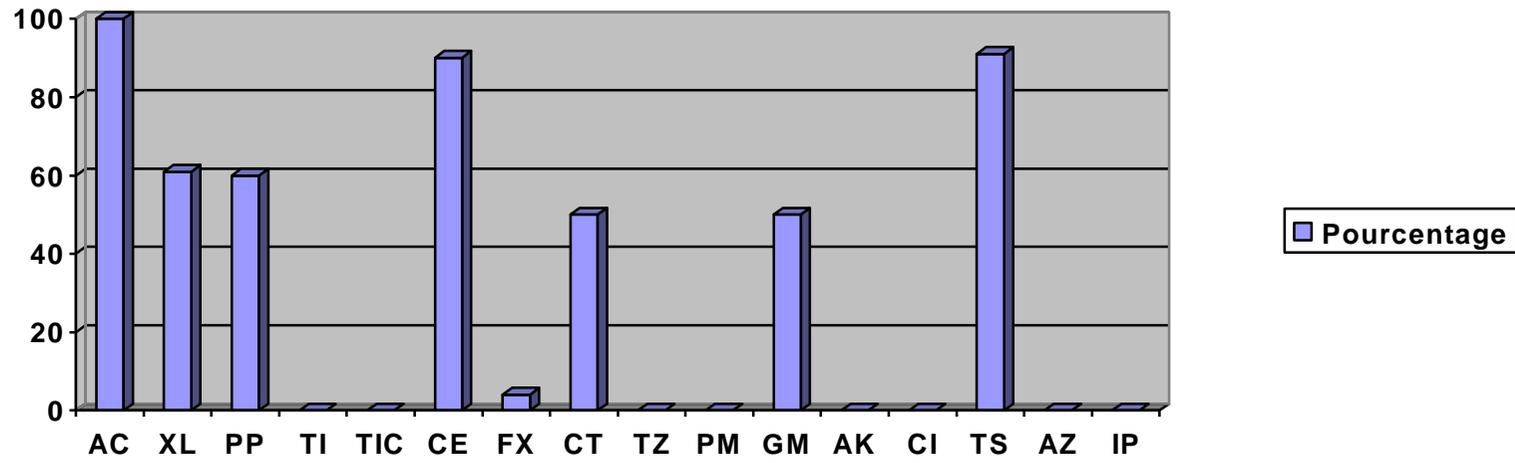
Antibiotiques		Pourcentage de résistance (%)				
Code	Nom	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. indol +</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AC	Amoxicilline	75	100	50	100	0
XL	Amoxicilline + Ac Clavula	48	59	19	61	0
PP	Pipéracilline	71	68	25	60	37
TIC	Ticarcilline	0	0	0	0	60
TCC	Ticarcilline + Ac clavula	0	0	0	0	30
CE	Céphalothine	82	60	56	90	0
FX	Céfoxitine	3	15	40	4	0
CT	Céfotaxime	3	29	25	50	0
TZ	Ceftazidime	0	0	0	0	5
PM	Céfepime	0	0	0	0	2
GM	Gentamicine	12	35	33	50	32
AK	Amikacine	1	9	6	0	1
CI	Ciprofloxacine	8	5	0	0	18
TS	Triméthoprime + sulfamétho	69	49	67	91	0
AZ	Aztréonam	0	0	0	0	32
IP	Inipenem	0	0	0	0	13

Escherichia coli :

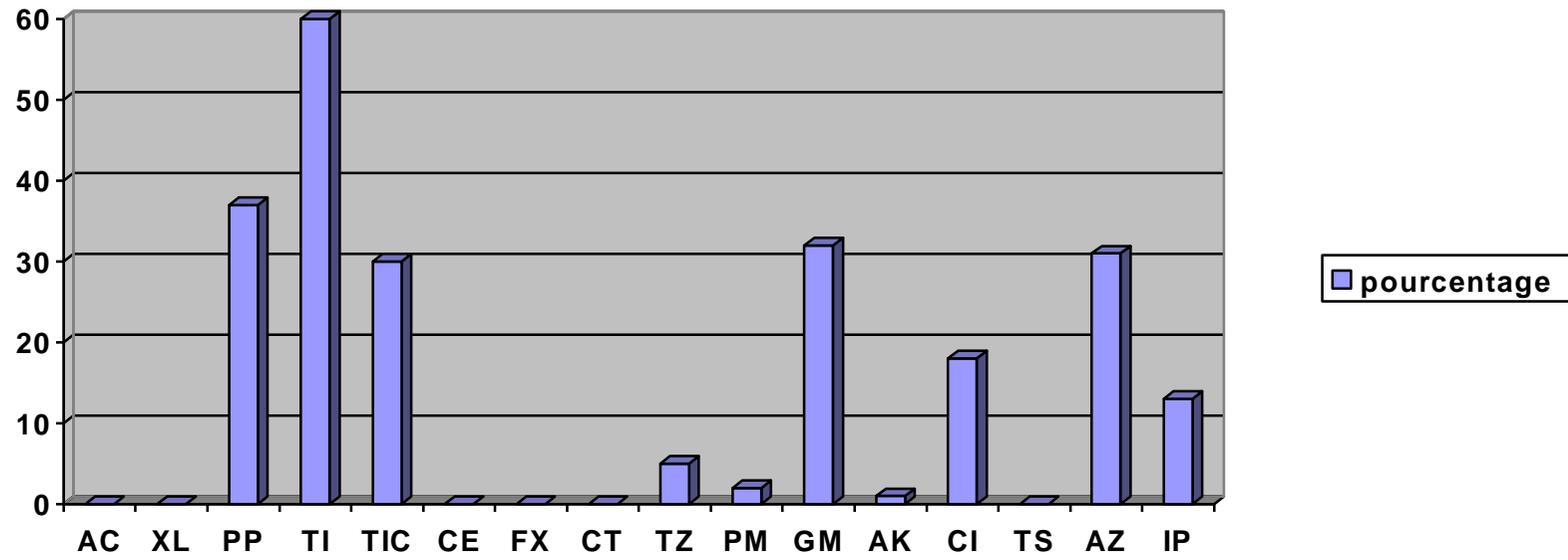
Klebsiella pneumoniae :

Proteus mirabilis

Proteus Indol + :



Pseudomonas aeruginosa :



DISCUSSION

Nos résultats ont montré :

- une résistance globale de toutes les souches à l'Amoxicilline avec un taux plus élevé pour *K. pneumoniae* et *P. Indol +* (100%).

Résistance atténuée par l'association de l'Acide clavulanique avec une réduction significative de la résistance pour chaque souche .

Ainsi pour *E. coli* la résistance passe de 75 à 48% , *K. pneumoniae* (100 à 59%) , *P. mirabilis* (50 à 19%), *P. Indol +* (100 à 61%) .

Cela se confirme avec la Ticarcilline à laquelle *P. aeruginosa* résiste à 60%. L'association Ticarcilline + Acide clavulanique permet de diminuer la résistance à 30% soit une baisse de moitié .

Il en ressort donc que l'Acide clavulanique permet d'améliorer la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux bêta-lactamines .

Notons au passage que *P. aeruginosa* n'est jamais sensible à l'Amoxicilline.

- les souches testées sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) dans leur grande majorité . Ces résultats sont contraires à ceux de Ndiaye Y K (95% de sensibilité).

E. coli est plus sensible avec des pourcentages de résistance bas :

Céfotaxime (3%), Céfoxitine (3%). Il est suivi de *P. aeruginosa* (5% à la Ceftazidime et 2% à la Céfépime) et de *P. Indol +* (4% à la Céfoxitine).

- l'Amikacine présente l'efficacité la plus appréciable avec un taux de résistance inférieur à 10% pour toutes les souches : 1% pour *E. coli*, 1% pour *P. aeruginosa*, 0% pour *P. indol +*, 6% pour *P. mirabilis* , 9% pour *K. Pneumoniae* qui est la moins sensible.

- la Ciprofloxacine est efficace avec des taux de résistance bas (< 10%) , sauf pour *P. aeruginosa* (18%).

- la Pipéracilline , la Céfalotine , l'association Triméthoprine-sulfaméthoxazole et dans une moindre mesure la Gentamicine sont peu efficaces sur les souches étudiées.

CONCLUSION :

La découverte des antibiotiques avait suscité un immense espoir chez les spécialistes de la santé, en particulier chez les microbiologistes. Cet espoir s'est vite dissipé laissant la place à une désolation totale du fait de la résistance bactérienne aux antibiotiques même de découverte récente.

Les céphalosporines de troisième génération jadis très actifs se sont montrées aujourd'hui d'une inefficacité relative sur les bacilles à Gram négatif sécréteurs de bêta-lactamases à spectre élargi.

Exceptés les Aminosides (Amikacine) et les Quinolones (Ciprofloxacine), presque toutes les familles d'antibiotiques testées n'ont pas donné de bons résultats sur les souches étudiées.

Cela suscite une grande inquiétude dès lors que la résistance bactérienne va plus vite que la découverte des antibiotiques. Il devient donc urgent de veiller :

- au respect d'une bonne prescription antibiotique par des praticiens qualifiés,
- au respect de la procédure requise qui fait appel au laboratoire de bactériologie pour la détermination de la sensibilité avant toute prescription antibiotique,
- à sensibiliser les patients sur l'importance de l'observance d'un traitement antibiotique.

Cela requiert la mise en place d'une politique de santé fiable en étroite collaboration avec les microbiologistes et tous les acteurs impliqués dans ce secteur.

En l'absence de mesures adéquates ne risque – t – on pas de revenir à la situation de départ c'est à dire de rester impuissant face à une infection bactérienne même modérée ?

L'avenir nous édifiera mais pour l'instant personne ne souhaite qu'on en arrive là .

