

Les infections respiratoires restent à l'heure actuelle les affections les plus fréquentes chez l'enfant.

Elles contribuent significativement à la morbidité en pédiatrie et à la mortalité des jeunes enfants dans les pays en développement avec un taux de létalité estimé à 15%. L'origine bactérienne majeure de ces maladies demeure : *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* et *Moraxella catarrhalis*. L'on a toujours su maîtriser ces infections respiratoires par une antibiothérapie probabiliste notamment avec des bêta-lactamines et surtout des macrolides. Mais depuis les années 80, elles sont de plus en plus compliquées à traiter.

DARWIN disait : « ce ne sont pas les espèces les plus fortes et les plus intelligentes qui survivent mais celles qui s'adaptent aux changements ».

Apparemment, les bactéries ont bien compris cela. Elles ont su s'adapter à l'utilisation croissante irrationnelle d'antibiotiques, favorisant l'apparition de résistance.

De plus une surveillance microbiologique défectueuse et des moyens thérapeutiques limités concourent aussi à l'émergence de résistance.

Cependant, on note l'apparition de plus en plus préoccupante de résistance croisée et de multirésistance donnant plusieurs profils à ces bactéries.

C'est cette diversité de phénotypes qui nous incite à l'étude des génotypes afin de mieux comprendre la résistance et d'apporter des solutions aux problèmes posés par l'antibiothérapie dans les infections respiratoires.

L'objet de notre étude est :

- d'établir l'état actuel de la résistance des principales bactéries responsables des infections respiratoires aux  $\beta$ - lactamines et macrolides;
- de prédire les causes génétiques de cette résistance.

## **I - DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE**

A l'origine, le terme antibiotique ne s'appliquait qu'à des molécules produites par des micro-organismes (bactéries, levures, actinomycètes) qui suppriment la croissance ou détruisent d'autres micro-organismes.

Depuis, le terme s'est généralisé aux antimicrobiens chimiques.

On distingue les antibiotiques bactériostatiques et les antibiotiques bactéricides.

Les premiers inhibent uniquement la croissance des microorganismes. L'induction d'une réponse immunitaire est nécessaire pour éliminer le pathogène.

Les seconds les détruisent et peuvent être utilisés même quand le patient est immunodéficient.

## **II - CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES [36]**

La classification des antibiotiques repose sur leur structure chimique et leur mécanisme d'action, lesquels conditionnent leur spectre d'activité.

### **II.1 BETA-LACTAMINES [10, 89]**

Les bêta-lactamines constituent la plus vaste et la plus prolifique famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique. Ces dernières années, la famille des bêta-lactamines s'est enrichie de nombreuses molécules particulièrement dans le groupe des céphalosporines. Cette croissance exponentielle constitue, avec la structure spéciale des molécules des bêta-lactamines, une des caractéristiques de ces antibiotiques.

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

### II.1.1 Structure [36, 79]

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

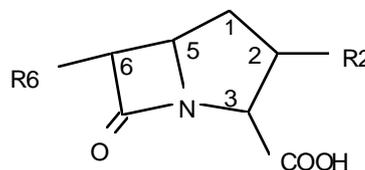
Les molécules de bêta-lactamines diffèrent, dans le cas des dérivés classiques, par la chaîne latérale substituant : l'acide 6-amino-pénicillanique (6 A.P.A.) dans le cas des pénicillines et l'acide 7-amino-céphalosporanique (7 A.C.A.) pour les céphalosporines.

Il existe des dérivés dits « non classiques » ayant un noyau central modifié mais possédant une structure apparentée.

Le représentant le plus ancien de cette famille est la pénicilline G.

#### ■ Premier groupe

##### ■ Formule générale



**Figure 1 : Formule générale du 1<sup>er</sup> groupe.**

#### ✚ Les pénams

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle thiazolidine, correspondant aux pénicillines. Les molécules se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone 6 et se répartissent en cinq sous-groupes :

- Le sous-groupe de la pénicilline G (benzylpénicilline) a pour spectre d'action les bactéries à Gram positif et les cocci à Gram négatif, à l'exception des souches productrices de pénicillinases. Il comprend la pénicilline G, ses formes

retard et quelques pénicillines orales (pénicilline V, phénéticilline, propicilline, clométhocilline);

- les pénicillines anti-staphylococciques, résistantes à la pénicillinase du staphylocoque : méthicilline et isoxazolyl - pénicillines (l'oxacilline, la cloxacilline, la dicloxacilline);

- les pénicillines à large spectre, actives aussi sur certains bacilles à Gram négatif mais sensibles à l'action de la pénicillinase du staphylocoque ou des  $\beta$ -lactamases des Gram négatifs;

- les aminopénicillines (l'ampicilline, l'amoxicilline, l'épicilline);

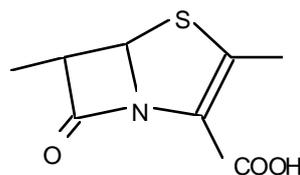
- les carboxypénicillines (la carbénicilline et la ticarcilline) et l'apalcilline;

- les amidinopénicillines (l'amidinocilline ou la mecillinam et la pivmécillinam) ne sont actives que sur les bacilles à Gram négatif;

- les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, produits dont le radical R6 est un halogène (I ou Br) ou pénicillines-sulfones notamment le sulbactam.

### Les Pénems

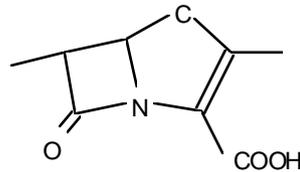
Ils se distinguent des pénams par l'existence d'une double liaison.



**Figure 2 : Formule des pénems.**

### Les Carbapénems

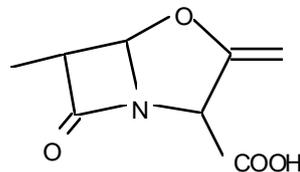
La N-formidoyl-thiénamycine ou imipénème est le seul produit actuellement utilisé. Doué d'un large spectre d'action, il est remarquable par sa grande stabilité vis à vis de diverses  $\beta$ -lactamases.



***Figure 3 : Formule des carbapénems.***

### Les Oxapénams ou clavams

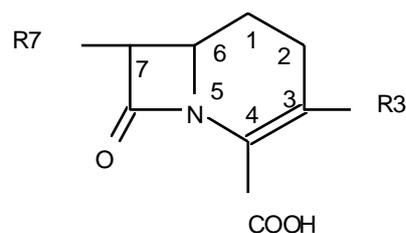
Le représentant de ce groupe est l'acide clavulanique, d'activité antibactérienne très faible mais utilisé comme inhibiteur de  $\beta$ -lactamases en association avec l'amoxicilline ou la ticarcilline.



***Figure 4 : Formule des oxapénams.***

## ■ Deuxième groupe

### ▣ Formule générale

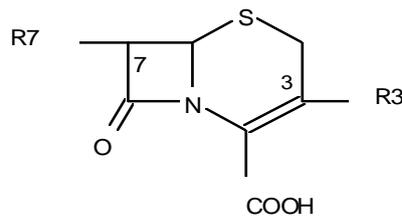


***Figure 5 : Formule générale du 2<sup>ème</sup> groupe.***

## Les Céphems

Ils correspondent aux céphalosporines au sens strict. Les produits utilisés sont des dérivés semi-synthétiques de la céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération elle même produite par un champignon (*Cephalosporium*).

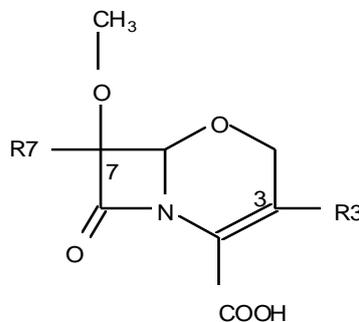
Certains céphems sont produits par des bactéries (*Streptomyces*). Ce sont les céphamycines (la céfoxitine, le céfotétan)



**Figure 6 : Formule des céphems.**

## Les Oxacéphems

Un seul produit de synthèse totale a été développé : le latamoxef.



**Figure 7 : Formule des oxacéphems.**

Céphems, céphamycines et oxacéphems sont globalement désignés sous le terme de céphalosporines et classés, selon leurs propriétés antibactériennes, en quatre "générations".

Ce sont tous des produits à large spectre, mais dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif. De ce point de vue, les trois générations se distinguent par leur niveau d'activité intrinsèque et leur résistance à l'inactivation par les  $\beta$ -lactamases.

### **Les Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération**

Elles peuvent être actives sur des souches résistantes aux pénicillines à large spectre. Elles sont par contre détruites par les céphalosporinases de nombreux bacilles à Gram négatif.

Les principaux produits sont les suivants : la céfalotine, la céfacétrile, la céfapirine, la céfalogridine, la céfazoline inactives par voie buccale ; la céfradine, la céfalexine, le céfadroxil, le céfaclor, la céfatrizine, actifs par voie buccale.

### **Les Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération**

Elles se distinguent des précédentes par une relative résistance à certaines céphalosporinases et un léger gain d'activité sur les souches sensibles. Ce sont les céfuroxime, céfamandole et céfoxitine.

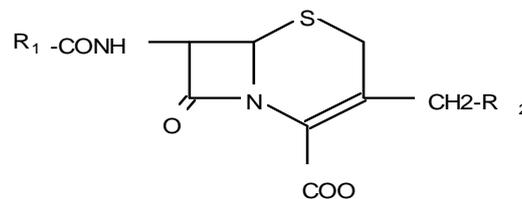
### **Les Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération**

Elles comprennent entre autres le céfotaxime, le latamoxef, la céftriaxone, la céftazidime, le céfménoxime et le céftizoxime.

Quelques molécules proches des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, présentent des avantages particuliers relatifs à leurs propriétés antibactériennes ou pharmacologiques : céfopérazone, céfatiam, céfotétan, cefsulodine, céfixime.

### **Les Céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération**

#### **Noyau de base**



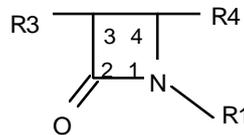
**Figure 8 : Formule des céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération.**

Ce sont des 7-méthoxyimino céphalosporines zwitterioniques, caractérisées par la présence d'un ammonium quaternaire en position C<sub>3</sub>. Elles montrent peu d'affinité pour les β-lactamases de classe I et pénètrent très rapidement au travers de la membrane extérieure des bacilles à Gram-négatif.

Elles comprennent au moins une demi-douzaine de produits incluant cefpirome, céfépime, cefclidine, céfzoprane.

### ■ Troisième groupe

#### ■ Formule générale



**Figure 9 : Formule générale du 3<sup>ème</sup> groupe.**

Il correspond aux monobactams. Un produit est actuellement utilisé, l'azthréonam. Son spectre est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies.

### **II.1.2 Mécanisme d'action des bêta-lactamines [ 11]**

Les bêta-lactamines appartiennent au groupe des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne. Toutes les bêta-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.

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

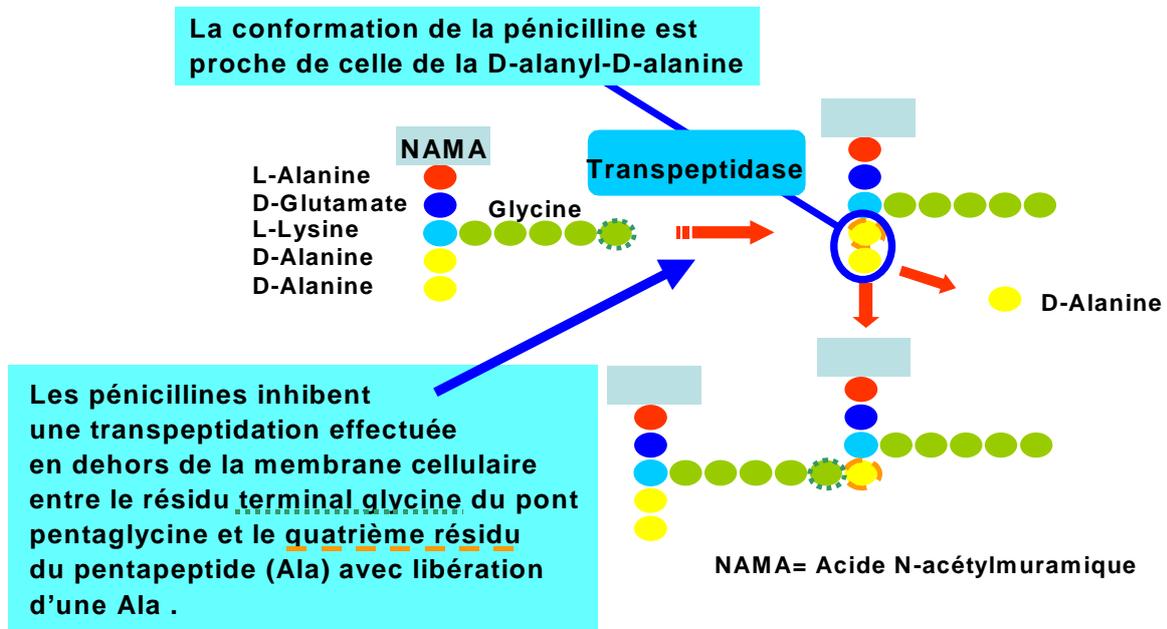
En règle générale, la paroi des bactéries à Gram positif se laisse pénétrer sans difficulté par les bêta-lactamines, car le peptidoglycane ne s'oppose pas au passage des molécules d'aussi petite taille.

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 bêta-lactamines qu'à travers les porines. Les porines sont des protéines transmembranaires ayant la faculté de se regrouper pour des canaux, des pores remplis d'eau, permettant ainsi la diffusion à travers la membrane de différents solutés hydrophiles.

### β-lactames: pénicillines

#### Mécanismes d'action

1) Inhibition de la transpeptidase (ex. *S. aureus*) → bloque la synthèse du peptidoglycane



*Figure 10 : Mécanisme d'action des bêta-lactamines [62]*

## $\beta$ -lactames : céphalosporines

### Mécanismes d'action : identiques aux pénicillines

- 1) Inhibition de la transpeptidase → bloque la synthèse du peptidoglycane

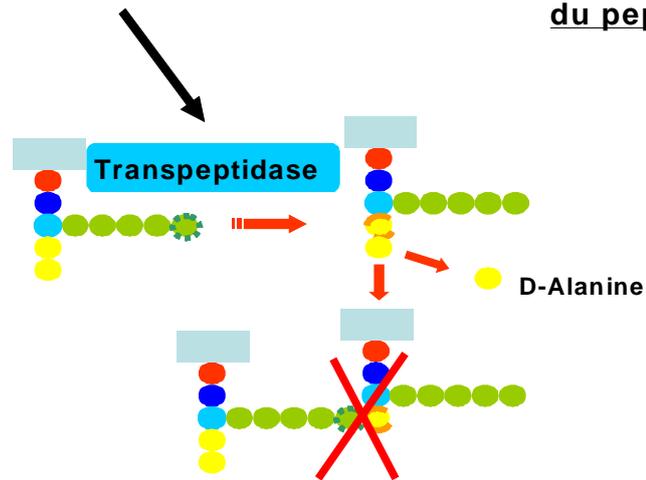


Figure 11 : Mécanisme d'action des Céphalosporines [62]

## II.2 LES MACROLIDES VRAIS

### II.2.1 Définition [ 87]

Les macrolides vrais sont des molécules naturelles, lipophiles, hétérosidiques, possédant un noyau lactonique central, oxygéné, composé de 12 – 16 chaînons avec peu ou pas de doubles liaisons et pas d'atomes d'azote endocyclique. Un ou plusieurs sucres neutres ou aminés sont fixés sur le noyau lactonique, conférant à ces molécules leur caractère basique.

Les macrolides vrais sont des bases faibles peu solubles dans l'eau et solubles dans la plupart des solvants organiques à l'exception du chloroforme (CCl<sub>4</sub>) et des alcanes. Ce sont des substances amères.

Les sels sont hydrosolubles. Le seul dosage microbiologique retenu par la pharmacopée française est la méthode par turbidimétrie ou diffusion.

### II.2.2 Classification [87]

Les principaux macrolides naturels sont : l'érythromycine, l'oléandomycine, la spiramycine et la josamycine.

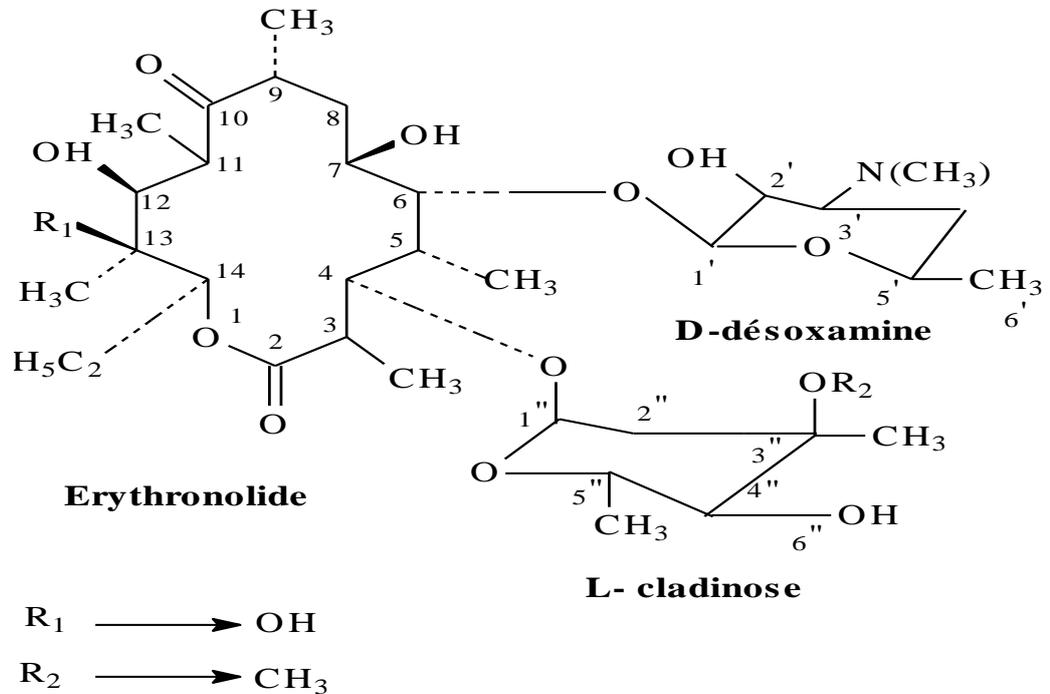
#### II.2.2.1 *Erythromycine*

L'érythromycine, obtenue par extraction biologique des cultures de *Streptomyces erythreus*, est en fait un mélange de plusieurs substances voisines dont une, largement majoritaire A, constitue le produit le plus utilisé en thérapeutique.

La formule chimique de l'érythromycine A comporte un cycle lactonique à 14 atomes appelé Erythronolide, un sucre, la cladinose et un sucre aminé, la désosamine.

Sur le plan pharmacologie, l'érythromycine présente une biodisponibilité très variable en raison de son instabilité en milieu acide, et ses taux sériques sont dès lors peu prédictibles lorsqu'elle est administrée par voie orale. Par ailleurs, elle

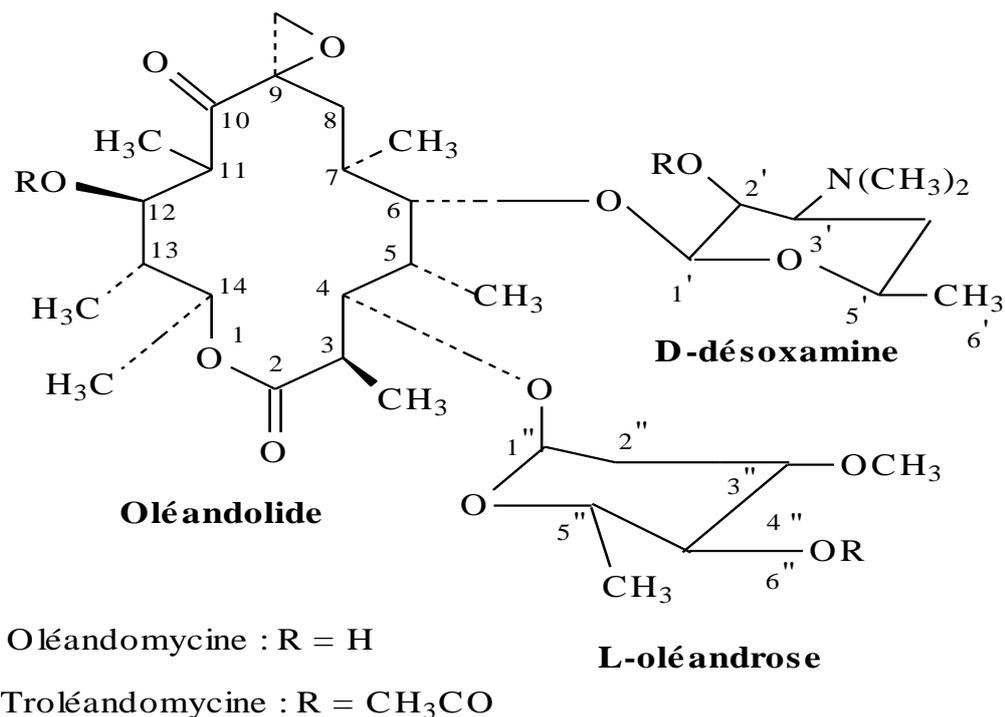
présente une demi-vie sérique courte rendant nécessaire des administrations multiples si l'on veut maintenir le plus longtemps possible sa concentration sérique au-dessus de la CMI du germe en cause.



***Figure 12 : Formule chimique de l'érythromycine A***

### II.2.2.2 Oléandomycine

L'oléandomycine est obtenue par fermentation de *Streptomyces antibioticus* et purifiée par cristallisation du chlorhydrate. Sa formule chimique comporte un cycle à 14 atomes lactoniques appelé oléandolide, un sucre, l'oléandrose et un sucre aminé, la désosamine.



**Figure 13** : Formule chimique de l'oléandomycine

### II-2-2-3 Spiramycine

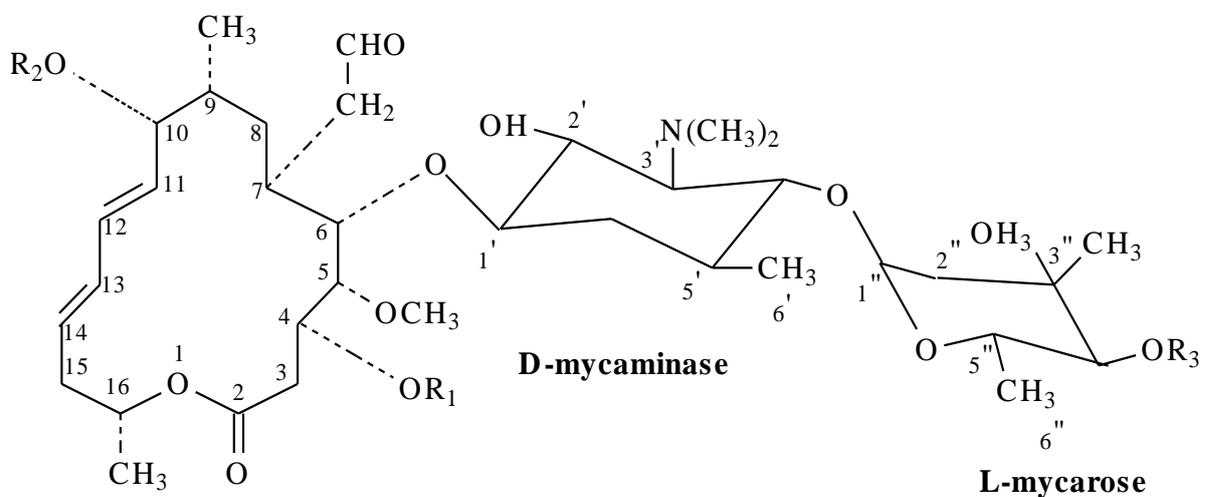
La spiramycine est un mélange de trois substances hétérosidiques très voisines, les spiramycines I (63 %), II (24 %) et III (13 %), extraites de *Streptomyces ambofaciens*.

La spiramycine I est un macrolide à 16 éléments formant la génine, substituée par trois sucres dont deux engagés dans un bioside. Les sucres fixés par le cycle par des liaisons osidiques sont identifiés à :

- un disaccharide constitué d'un aminosucre, la D-mycaminose et de la L-mycarose, unies par une liaison 1-4 ;

- un second aminosucre, l'isomycarnine fixée en 10.

Les spiramycines II et III sont respectivement des esters acétiques et propioniques de la spiramycine I en position 4. Le produit usuel est un mélange dosé en Unités Internationales.



**Figure 14** : Formules chimiques de la spiramycine et de la Josamycine

Spiramycine I	$R_1 = H$	$R_2 = (H_3C)_2 N$	$R_3 = H$
Spiramycine II	$R_1 = COCH_3$	$R_2 = id.$	$R_3 = H$
Spiramycine III	$R_1 = CO-CH_2-CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = H$
Josamycine	$R_1 = CO-CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = (H_3C)_2 CH-CH_2-COH$

#### ***II.2.2.4 Josamycine***

La josamycine est produite par *Streptomyces narbonensis var josamyceticus*.

Sa structure est proche de celle de la spiramycine avec une génine à 16 atomes et un disaccharide à deux sucres ; mais elle ne comporte pas d'aminosucres substitués en 10. Elle est basique.

### **II.2.3 Mécanisme d'action des Macrolides [6, 34, 50]**

Les macrolides doivent leur activité antibiotique à leur liaison à la sous-unité 50S du ribosome bactérien et plus précisément au niveau du complexe 23S du rRNA en établissant des contacts limités mais précis entre une zone du domaine II [hairpin 35] et la boucle de la peptidyl-transférase dans le domaine V ; ces deux régions formant une poche adaptée aux macrolides et à d'autres antibiotiques.

La liaison des macrolides à ce site entraîne une inhibition de la synthèse protéique.

Ce mode d'action implique que les macrolides sont essentiellement bactériostatiques, sauf à concentration très élevée.

## **II-3 LES LINCOSAMIDES**

### **II.3.1 Classification [87]**

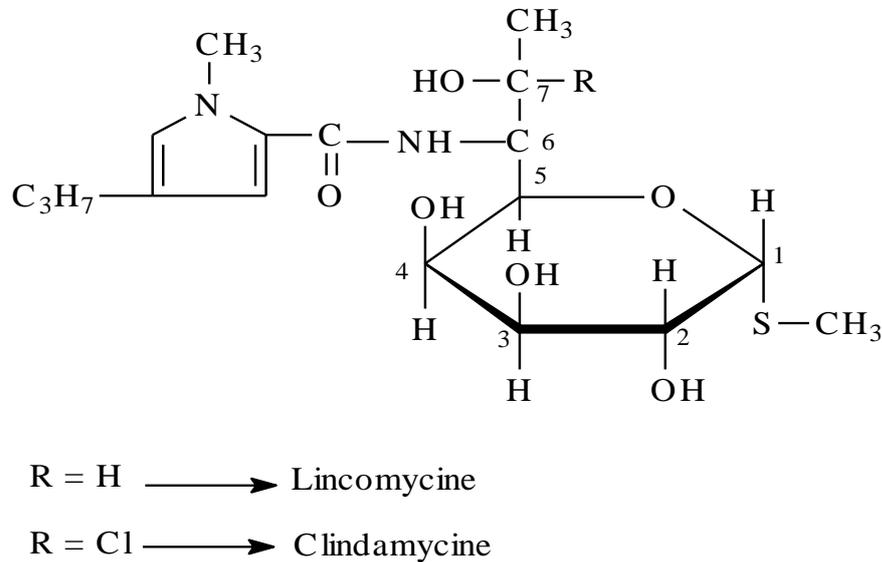
#### ***II.3.1.1 La Lincomycine***

Elle est obtenue par fermentation de *Streptomyces lincolnensis*. Elle résulte de l'acidification d'un amino-acide cyclique par un aminosucre soufré, la pyranose. La présence au niveau du radical amino-acide d'une fonction amine tertiaire confère à la molécule un caractère basique.

#### ***II.3.1.2 La Clindamycine***

C'est un dérivé hémisynthétique chloré qui résulte de la chloration de l'hydroxyle en position 7 de la lincomycine par le chlorure de thionyle ou le chlore avec inversion de configuration du carbone porteur. Lincomycine et clindamycine

ne contiennent pas de noyaux lactoniques comme les macrolides. Elles sont basiques.



***Figure 15 : Formules chimiques de la Lincomycine et de la Clindamycine***

### **II.3.2 Mécanisme d'action**

Le mécanisme d'action des lincosamides, comme pour les macrolides, implique des récepteurs ribosomaux de la fraction 50S avec inhibition de la phase initiale de la synthèse protéique.

Cette inhibition survient dans les premières étapes par impossibilité de fixation de l' amino-acyl-tRNA au site A et de formation de la liaison peptidique.

## **II.4 STREPTOGRAMINES OU SYNERGISTINES [87]**

### **II.4.1 Classification**

Les streptogramines comprennent deux antibiotiques commercialisés :

- la pristnamycine extraite de *Streptomyces pristinae spiralis* ;
- la virginiamycine isolée à partir de *Streptomyces virginiae*.

### *II.4.1.1 La Pristinamycine*

La pristinamycine est un mélange de deux groupes de constituants :

- le constituant du groupe I (ou B) est un cyclopeptide amphoter ;
- le constituant du groupe II (ou A) est un macrolide.

### *II.4.1.2 La Virginiamycine*

La virginiamycine se compose de deux facteurs : le facteur I (ou S) est un depsipeptide ; le facteur II (ou M) est une lactose macrocyclique.

**Tableau I : Constituants du groupe I dans la Structure des Streptogramines**

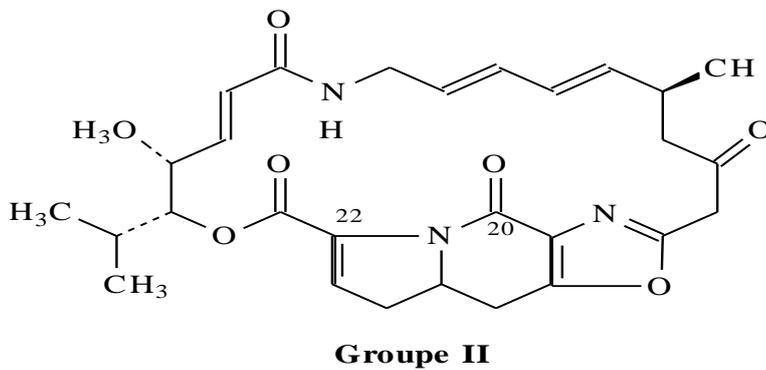
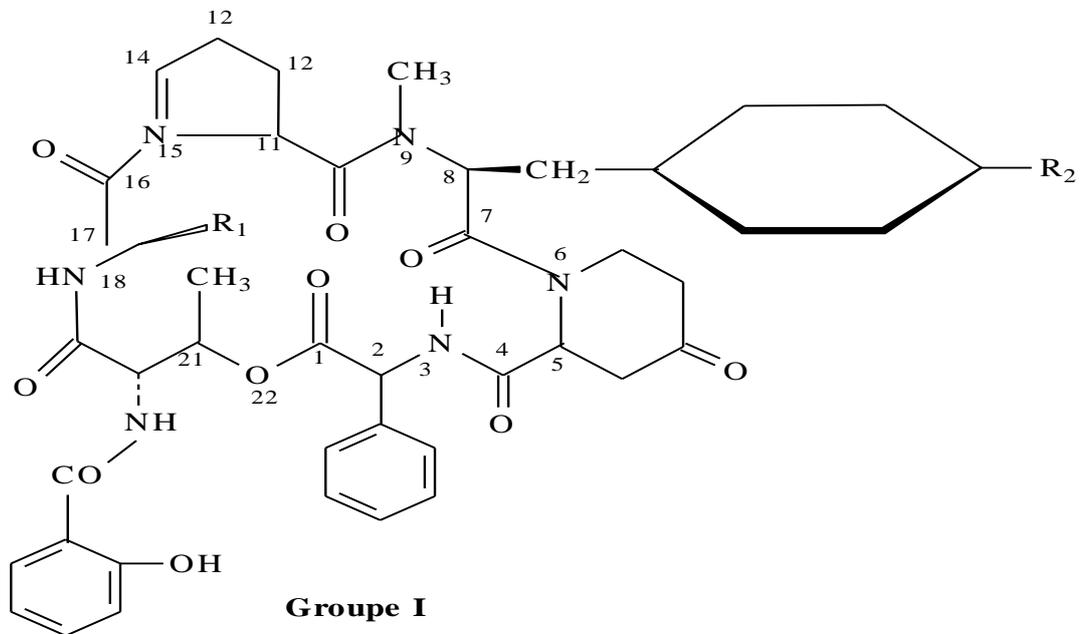
<b>Groupe I</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Pristinamycine I <sub>A</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Pristinamycine I <sub>B</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH(CH <sub>3</sub> )
Pristinamycine I <sub>C</sub>	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Virginiamycine S	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H

**Tableau II : Constituants du groupe II dans la Structure des Streptogramines**

<b>Groupe II</b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Pristinamycine II <sub>A</sub> = Virginiamycine M <sub>1</sub>	Δ <sub>22</sub>
Pristinamycine II <sub>B</sub> = Virginiamycine M <sub>2</sub>	Δ <sub>22</sub> saturée

Les structures des constituants du groupe I sont apparentées de même que celles du groupe II.

Les streptogramines ne contiennent pas de sucre.

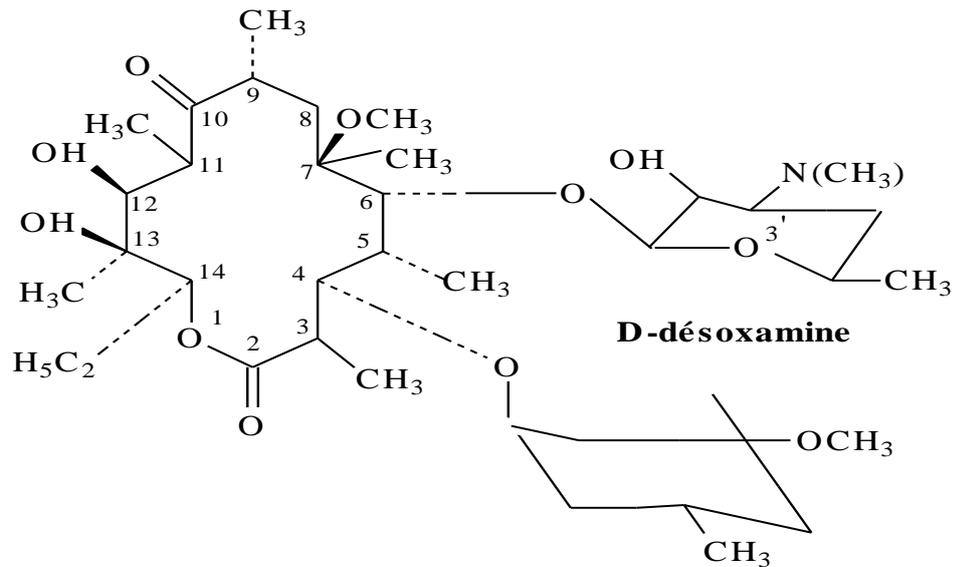


***Figure 16 : Formules chimiques de la Pristinamycine et de la Virginiamycine***



### II.5.1.2 Clarithromycine

La clarithromycine est un dérivé hémisynthétique de l'érythromycine A à 14 atomes de carbone comme la roxithromycine. Elle est obtenue en bloquant le point d'ancrage en position 7 par un méthyl.



***Figure 18 : Formule chimique de la Clarithromycine***

### II.5.2 Mécanisme d'action des dérivés de l'érythromycine A

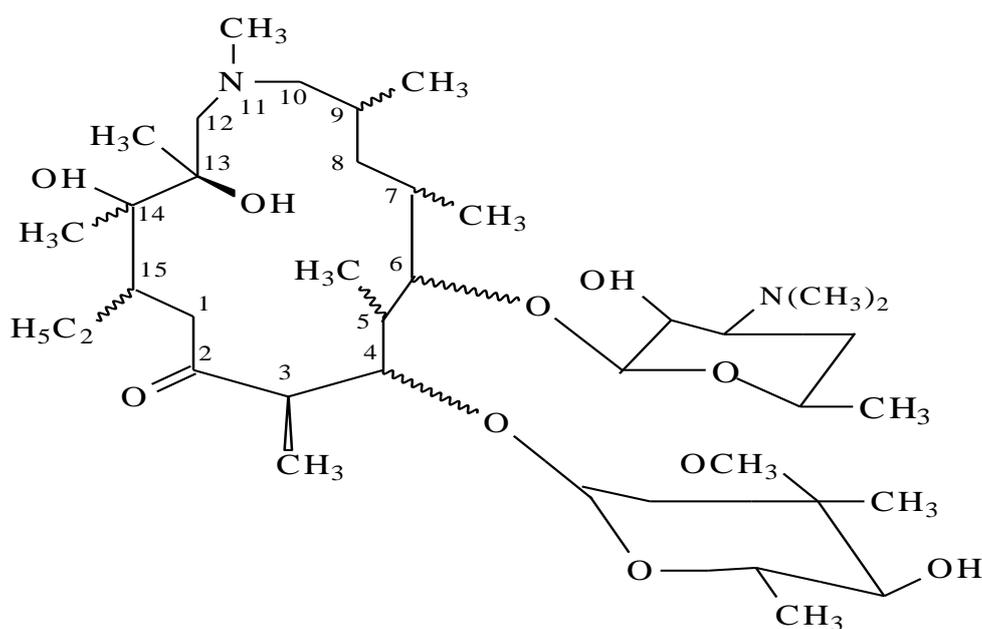
Le mécanisme d'action est le même que celui des macrolides vrais.

## II.6 LES AZALIDES : L'AZITHROMYCINE

### II.6.1 Définition et structure

L'azithromycine est un antibiotique de la classe des Azalides (famille des macrolides).

C'est un méthyl-aza-11-désoxo-10-homoérythromycine A avec un azote inclus dans le macrocycle qui est agrandi à l'endroit du carbonyle. C'est une molécule à 15 atomes de carbone obtenue par une transposition de BECKMAN de l'oxime de l'érythromycine A à l'aide du chlorure de tosylo, avec formation d'un iminoéther, suivie d'une hydrogénation et d'une méthylation de l'azote du cycle.



**Figure 19 : Formule chimique de l'Azithromycine**

## II.6.2 Mécanisme d'action

Dérivée structurellement de l'érythromycine, l'azithromycine présente un mécanisme d'action similaire. Elle exerce une action antibactérienne par inhibition de la synthèse des protéines microbiennes.

## II.7 LES KETOLIDES

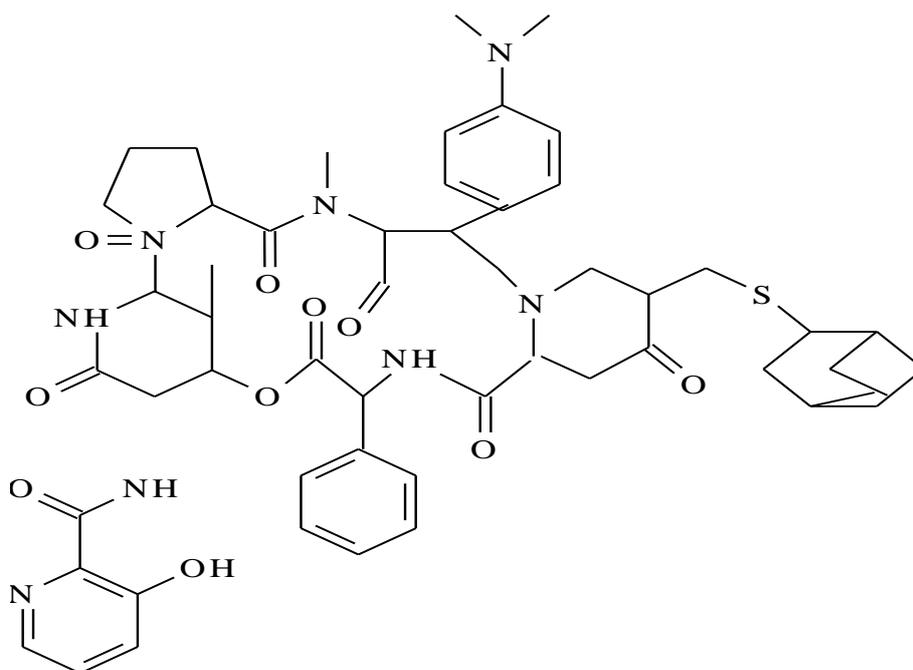
### II.7.1 Définition et Structure

Quinupristine – Dalfopristine est un nouvel antibiotique de la famille des Macrolides, groupe des Streptogramines, sous-groupe des Kétolides..

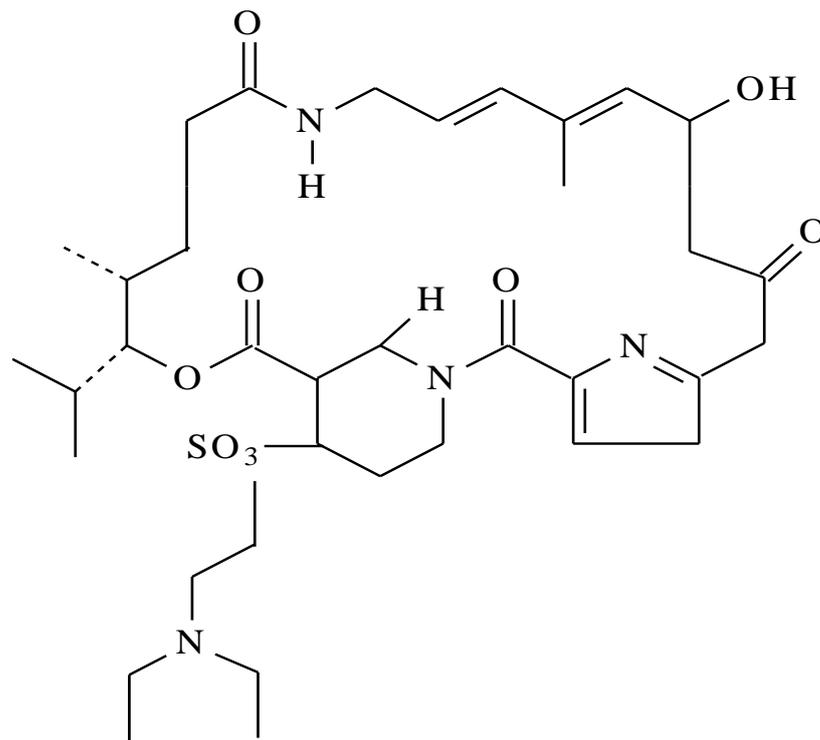
Comme son nom l'indique, elle est constituée d'un mélange de deux molécules, dérivés hémisynthétiques de la Pristinamycine solubles dans l'eau.

La Quinupristine (RP 57669), qui est une streptogramine du groupe B (I) représente 30% du mélange : c'est la quinuclidinylthiométhyl pristinamycine IA.

La Dalfopristine (RP 54476) est une streptogramine du groupe A (II) et représente 70% du mélange ; c'est la diéthyl amino éthyl-sulphonyl pristinamycine IIA.



**Figure 20 : Quinupristine (RP 57669)**



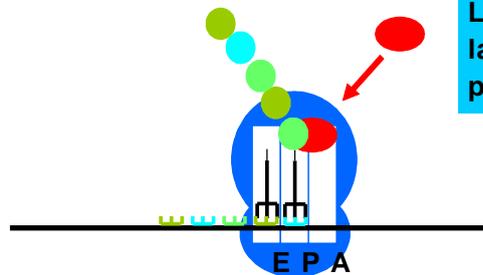
***Figure 21 : Dalfopristine (RP 54476)***

### **II.7.2 Mécanisme d'action**

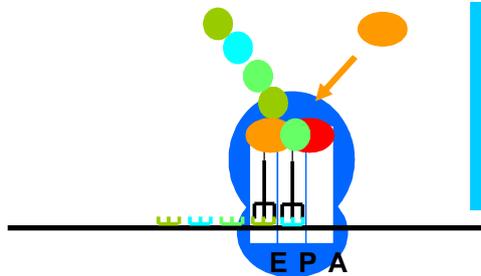
SYNERCID possède une action en deux temps. La Dalfopristine, streptogramine A se fixe d'abord sur la sous-unité 50S du ribosome. La fixation de la Quinupristine, streptogramine B verrouille ensuite celle de la Dalfopristine d'où une inhibition irréversible de la synthèse protéique et une bactéricidie.

## Streptogramines (quinupristine/dalfopristine)

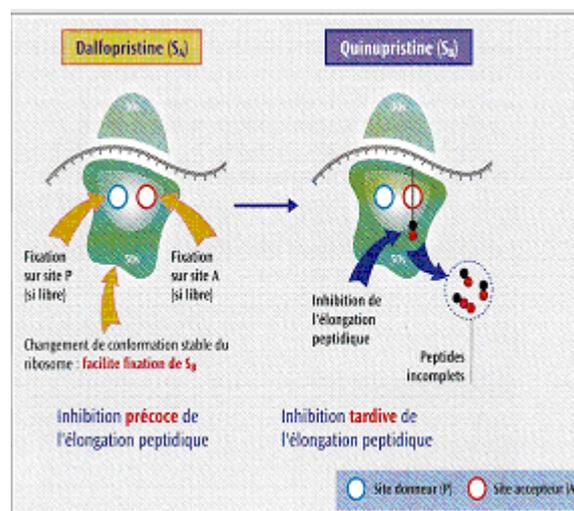
Mécanisme d'action:



La liaison de la dalfopristine change la conformation de la sous-unité 50S, permettant la liaison de la quinupristine.



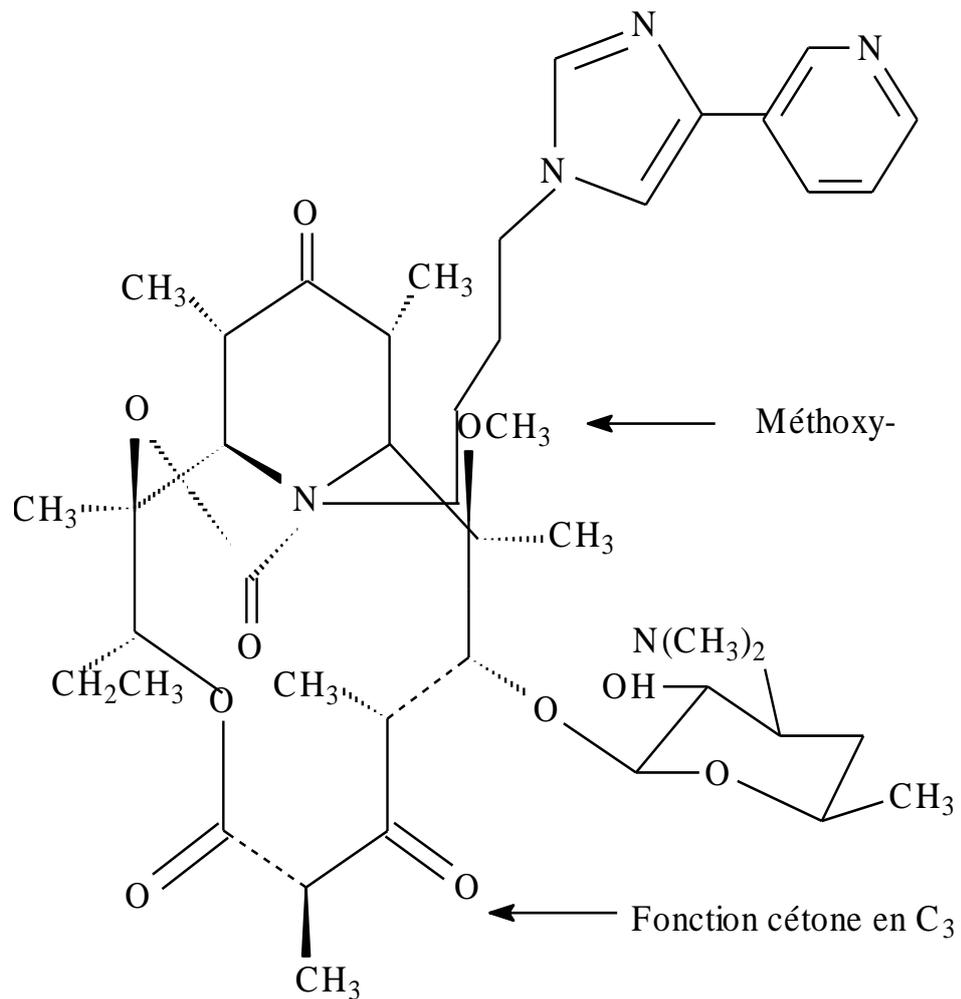
La synthèse des protéines dans le complexe antibiotique/ribosome est inhibée par plusieurs mécanismes dont la formation de la chaîne peptidique et son extrusion du ribosome. Bactéricide chez de nombreuses espèces.



***Figure 22 : Mécanisme d'action des streptogramines [62]***

### ■ La Télithromycine

Son mécanisme d'action s'apparente à celui des macrolides bien que des différences au niveau moléculaire puissent exister : la Télithromycine agit par blocage de la traduction de l'ARN au niveau de la fraction ribosomale 23S et certaines données indiquent également qu'elle est capable de bloquer la formation de la sous-unité 30S.



***Figure 23 : Structure de la Télithromycine***

### **III - RESISTANCE BACTERIENNE [20, 51]**

L'utilisation croissante des antibiotiques a fortement contribué à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques.

#### **III.1 DEFINITION**

La résistance bactérienne aux antibiotiques a deux définitions :

- une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration atteignable *in vivo* ;

- 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 (rapport technique n° 210 de l'organisation mondiale de la santé 1961).[51]

#### **III.2 LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE [20]**

D'une manière générale, la résistance des bactéries aux antibiotiques est de déterminisme génétique. Elle est soit naturelle, soit acquise. Elle peut aussi être clinique.

##### **III.2.1 La résistance naturelle**

La résistance naturelle d'une espèce ou d'un genre est :

- Une caractéristique propre, concernant l'ensemble des souches de l'espèce ou du genre ;

- Portée par un chromosome donc toujours transmissible à la descendance : transmission verticale ;

- Un caractère permettant de définir le phénotype sauvage ou sensible de l'espèce ;

- Une aide à l'identification d'une espèce.

### **III.2.2 La résistance acquise**

La résistance acquise, pour sa part :

- ne concerne qu'une proportion plus ou moins importante, variable dans le temps, de souches d'une espèce ;
- résulte d'une modification génétique par mutation ou par acquisition de plasmides ou transposons, (résistance extra chromosomique) transmissible horizontalement, parfois entre espèces différentes ;
- définit des phénotypes «résistants».

Les résistances croisées s'expriment au sein d'une même classe d'antibiotiques et sont dues au même mécanisme de résistance.

### **III.2.3 La résistance clinique**

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

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

## **III.3 SUPPORT GENETIQUE [65]**

Au plan génétique, la résistance acquise peut survenir par mutation ponctuelle, par remaniement du génome ou par acquisition de matériel génétique étranger.

Il existe deux supports essentiels.

### **III.3.1 Résistance chromosomique**

#### **■ *Résistance chromosomique par mutation***

Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle dans un gène de résistance entraînant par exemple une hypersécrétion d'enzymes inactivant les antibiotiques ou dans un gène de structure qui modifie le spectre d'une enzyme.

Une mutation se caractérise par :

- la rareté,
- la spontanéité,
- la discontinuité,
- la spécificité et l'indépendance,
- la stabilité

#### **■ *Résistance chromosomique par remaniement***

Il peut s'agir d'un remaniement du génome. A titre d'exemple, il peut s'agir de l'insertion de séquences apportant un promoteur permettant d'exprimer des gènes silencieux ou alors de l'acquisition de fragments de chromosomes étrangers par transformation.

### **III.3.2 Résistance extra chromosomique**

L'information génétique est portée par des plasmides transférables à d'autres bactéries par conjugaison, par traduction ou par transformation [65].

L'ensemble de ces gènes peuvent être sur des fragments d'ADN appelés transposons qui peuvent s'intégrer soit dans des plasmides, soit dans le chromosome en allant de l'un à l'autre.

### III.4 PHENOTYPE DE RESISTANCE

C'est un groupe, un ensemble d'ATB permettant au mieux, avec le plus de précision possible de préjuger des mécanismes de résistance dont dispose une bactérie donnée et notamment mais pas exclusivement de son équipement enzymatique [70].

Au sein de chaque espèce, on distingue le phénotype sauvage ou sensible, déterminé par les mécanismes naturels de résistance, et les phénotypes résistants déterminés par des mécanismes acquis de résistance [54].

### III.5 LES MECANISMES DE RESISTANCE

Trois mécanismes permettent d'expliquer la résistance aux antibiotiques :

- Modification de la cible des antibiotiques ; il peut s'agir :
  - de la substitution de la cible au profit d'une autre cible
  - de la diminution de l'affinité de la cible pour l'antibiotique
- synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques;
- diminution de la quantité d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie. Elle peut être due à :
  - une diminution de la perméabilité bactérienne vis à vis de l'antibiotique ;
  - un efflux actif de l'antibiotique de l'intérieur vers l'extérieur de la bactérie.

Plusieurs de ces mécanismes peuvent coexister chez une même bactérie et agir «en synergie», conférant une résistance plus élevée non seulement aux antibiotiques d'une même famille, mais également à des antibiotiques de familles différentes, surtout en cas de modification de la perméabilité.

### **III.5.1 La résistance de *Streptococcus pneumoniae***

Jusque dans les années 1970, les pneumocoques étaient sensibles à la pénicilline G qui représentait, avec les amino-pénicillines, le traitement de choix des pneumopathies. Mais des phénomènes de résistance acquise vis-à-vis de nombreux antibiotiques ne cessent d'émerger.

#### ***III.5.1.1 Résistance aux bêta-lactamines***

La première description de pneumocoque à sensibilité diminuée à la Pénicilline G a été faite par HANSMAN en 1967 à Sydney en Australie [47]. En 1977, des souches possédant un haut niveau de résistance à la Pénicilline G et des souches multirésistantes sont décrites en Afrique du Sud [23].

La résistance aux Céphalosporines de troisième génération est beaucoup plus récente [16].

Depuis, cette résistance est signalée dans de nombreux pays avec une fréquence croissante.

Ces résistances, d'origine chromosomique, ne sont pas dues à une production de bêta-lactamases ; elles résultent de modifications dans les protéines cibles de la bactérie : les protéines liant la Pénicilline (PLP).

Le pneumocoque possède six PLP dont cinq de haut poids moléculaire (PLP1a, PLP1b, PLP2x, PLP2a, PLP2b) et une de bas poids moléculaire (PLP3). Chaque bêta-lactamine semble agir par l'intermédiaire de plusieurs PLP préférentielles, qui sont différentes selon les molécules.

La résistance de bas niveau à la Pénicilline semble être due à la diminution de l'affinité de la PLP2x et 2b. Le haut niveau de résistance requiert une diminution de l'affinité de PLP supplémentaires : les PLP2b, 1a et 2x. La résistance aux Céphalosporines de troisième génération est liée à des modifications de deux PLP : les PLP2x et 1a [71].

L'étude des mécanismes de résistance a mis en évidence l'existence d'échanges génomiques entre les pneumocoques, mais aussi entre les pneumocoques et certaines espèces de streptocoques commensales du nasopharynx fréquemment exposées aux antibiotiques, auxquels pourraient s'ajouter des mutations ponctuelles, ce qui souligne le rôle des antibiotiques dans l'émergence de ces résistances [94].

La résistance à la Pénicilline est surtout observée dans les sérogroupes 23, 6, 19, 9 et le sérotype 14 [69].

### ***III.5.1.2 Résistance aux MLS<sub>B</sub>***

Elle est apparue en 1967 et ne cesse de croître dans de nombreux pays.

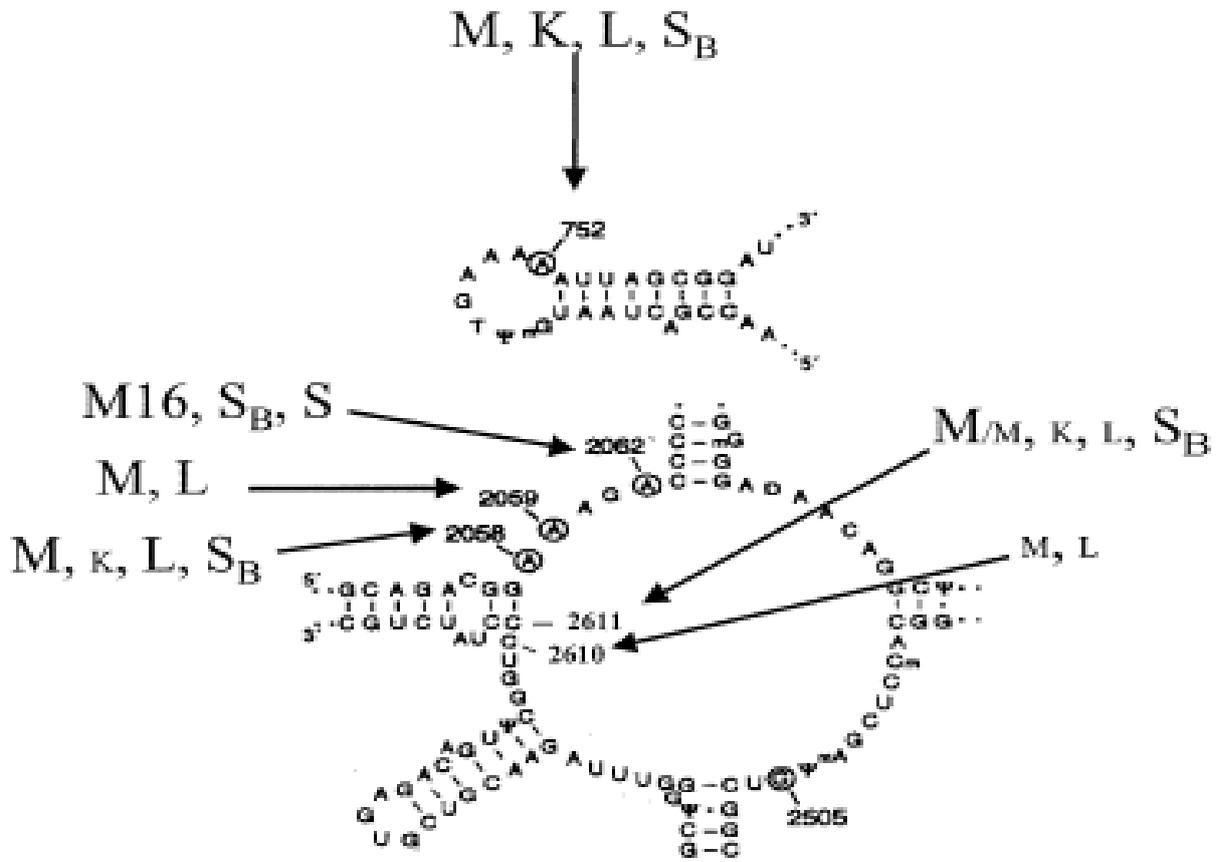
Deux principaux mécanismes sont à la base de cette résistance :

- une modification de la cible (sous-unité 50S du ribosome) par une méthylase ribosomale codée par le gène *ermB*. Ce gène est associé à la résistance de haut niveau aux Macrolides – Lincosamides - Streptogramines B. Les germes résistants par ce gène expriment le phénotype MLS<sub>B</sub> constitutif (cMLS<sub>B</sub>) ou inductible (iMLS<sub>B</sub>) ;

- un efflux actif de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie, lié au gène *mefA*. Ce gène est responsable de la résistance de bas niveau aux macrolides et détermine le phénotype M. Les bactéries résistantes par ce gène sont sensibles à la clindamycine et aux streptogramines B.

D'autres mécanismes ont été récemment décrits. Il s'agit :

- d'un mécanisme de résistance codé par le gène *ermA* (*ermTR*) ;
- d'altérations des protéines ribosomales L4 et L22, et de mutations de l'ARN ribosomal 23S.



**Figure 24** : Structure du domaine II et V de la sous unité 23S de l'ARNr de *E. coli* [61]

### III.5.1.3 Résistance aux Kétolides

Les kétolides sont considérées comme une alternative face aux pneumocoques multirésistants. En effet, la littérature est unanime sur l'excellente activité des kétolides sur les pneumocoques sensibles et résistants à la Pénicilline et aux macrolides, indépendamment des mécanismes de résistance [18, 73, 97].

Cependant, on observe *in vitro* après une exposition répétée du germe à l'antibiotique, le développement d'une résistance à la télichromycine [31]. Le mécanisme évoqué est une modification de la cible, notamment une diméthylation de l'ARNr par le gène *ermE* [63].

### **III.5.2 La résistance chez *Haemophilus influenzae* [26]**

L'espèce *Haemophilus influenzae* est naturellement résistante aux lincosamides et peu sensible à l'action des macrolides et de la pénicilline G.

#### ***III.5.2.1 Résistance aux bêta-lactamines* [30]**

Les bêta-lactamines représentaient, jusque dans les années 1970, la thérapeutique de référence. Mais de plus en plus, on note la production par l'espèce de bêta-lactamases.

- Ainsi le germe est résistant à l'ampicilline, par production d'une enzyme de type TEM1 plasmidique.

- La résistance à l'amoxicilline peut être observée chez les souches non productrices de bêta-lactamases. Cette résistance peut être due à une altération d'origine chromosomique des protéines de liaison aux pénicillines ou à une diminution de la perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques.

### **III.5.3 La résistance chez *Moraxella catarrhalis***

Elle est en général sensible aux antibiotiques (macrolides et apparentés...).

#### ***III.5.3.1. Résistance aux bêta-lactamines* [15]**

La résistance est due à la sécrétion de bêta-lactamases hydrolysant le cycle bêta-lactame.

Les souches de *Moraxella catarrhalis*, productrices de bêta-lactamases, sont résistantes à l'ampicilline et aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération.

Toutefois, la ticarcilline, les uréido-pénicillines, la céfoxitine, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont actifs et sont insensibles aux pénicillinases de *Moraxella catarrhalis*.

**Tableau III : Gènes impliqués dans la résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramins et kétolides due par méthylation ribosomale**

Phénotypes de résistance	Nom des gènes	Gènes impliqués	Profil de résistance						
			M14-15	M16	L	S <sub>B</sub>	S <sub>A</sub>	S <sub>A+B</sub>	K
MLS <sub>B</sub> (i)	erm (B)	erm(AM)	R	R	r ou R	r ou R	S	S	S
MLS <sub>B</sub> (c )	erm (B)	erm(B) erm(BC) erm(P), erm(PB) <sup>a</sup> ermIP erm(Z), erm(BZI), erm(BZ2) <sup>a</sup> erm erm(2)	R	R	R	R	S	S	R
MLS <sub>C</sub>	erm(A)	erm(A) erm(TR)	R	R	R	R	S	S	R

i = inductible

c= constitutive

a) *Quand deux ou trois gènes sont classés sous le terme de gène inclus cela veut dire que le même gène a été désigné par deux ou trois noms différents dans la littérature ;*

**Tableau IV : Gènes impliqués dans la résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramins et kétolides  
due par phénomène d'efflux**

Phénotypes de résistance	Nom des gènes	Gènes impliqués							
			M14-15	M16	L	S <sub>B</sub>	S <sub>A</sub>	S <sub>A+B</sub>	K
M <sub>14</sub> <sup>(1)</sup>	mef(A)	mef(A)	R	S	S	S	S	S	S
L <sup>(1)</sup>	cli	mef(E)	S	S	R	S	S	S	S
M <sub>16</sub>	srm(B)	srm(B)	S	R	S	S	S	S	S
M <sup>(2)</sup> et MS <sup>(2)</sup>	Acr AB	Acr AB	R	R	S	S	S	S ou R	S

(1) *Streptococcus pneumoniae*

(2) *Haemophilus influenzae*

M14-15 = Macrolides à 14 et 15 atomes

M16 = Macrolides à 16 atomes

L = Lincosamides

S<sub>B</sub> = streptogramine B

S<sub>A</sub> = streptogramine A

S<sub>A+B</sub> = streptogramine A + streptogramine B

K = kétolides

**Tableau V : Gènes produits dans la résistance aux M.L.S.K**

Phénotypes de résistance	Gènes produits	Profil de résistance						
		M14-15	M16	L	S <sub>B</sub>	S <sub>A</sub>	S <sub>A+B</sub>	K
MLS <sub>B</sub> <sup>(1)</sup>	rrl (domaine V de la sous unité 23S de l'ARNr)	R	R	r ou R	r ou R	S	S	S
ML <sup>(1)</sup>	rrl (domaine V de la sous unité 23S de l'ARNr)	R	R	R	S	S	S	S
ML <sup>(1)</sup> (bas niveau)	rrl (domaine V de la sous unité 23S de l'ARNr)	R	S	R	S	S	S	S
MS <sub>B</sub> <sup>(1)</sup>	rrl (domaine V de la sous unité 23S de l'ARNr) rplD (protéine L4)	R	S	S	R	S	S	S
MLS <sub>B</sub> K <sup>(1)</sup>	rrl (domaine V de la sous unité 23S de l'ARNr)	R	R	R	R	S	S	R
MS <sup>(1)</sup>	rplV(protéine L22)	R	R	S	S	S	R	S
M et MS <sup>(2)</sup>	Fts I	R	S ou R	S	S	S	R	S

(1) *Streptococcus pneumoniae*(2) *Haemophilus influenzae*

M14-15 = Macrolides à 14 et 15 atomes

M16 = Macrolides à 16 atomes

L = Lincosamides

S<sub>B</sub> = streptogramine BS<sub>A</sub> = streptogramine AS<sub>A+B</sub> = streptogramine A + streptogramine B

K = kétolides

**Tableau VI : Principaux mécanismes de résistance aux bêta-lactamines**

Phénotype de résistance	Mécanisme de résistance	Gènes produits	β-lactamines	
			Pénicilline	C III G
Péni G <sup>(1)</sup>	Diminution de l'affinité de la PLP 2x et 2b	Mutation	r	S
Péni G <sup>(1)</sup>	Diminution de l'affinité de la PLP 2x, 2b, 1a	mutation	R	S
CIII R	Diminution de l'affinité de la PLP 1a et 2x	mutation	S	R
Ampi R/BL <sup>-</sup> (2)	Diminution de l'affinité de la PLP 3A et/ou 3B	Fts I	R	
Ampi R/BL <sup>+</sup> (2)	Excrétion β lactamases	TEM <sub>1</sub> plasmidique	R	

(1) *Streptococcus pneumoniae*(2) *Haemophilus influenzae*

## IV - EPIDEMIOLOGIE [91]

Les infections respiratoires aiguës sont responsables de ¼ des consultations de médecine et de 1/3 des journées de travail perdues. Elles représentent ¾ des problèmes de pathologies infectieuses des généralistes. La majorité des infections respiratoires aiguës sont communautaires.

L'étiologie des pneumonies communautaires est multiple. Il peut s'agir des bactéries dans (70 – 80%) des cas majoritairement *Streptococcus pneumoniae* occasionnellement *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, bacilles Gram (-), *Moraxella catarrhalis*.

Les bactéries atypiques sont rencontrées dans (10 – 20%) des cas. Il s'agit de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiae pneumoniae*, *Legionella pneumophila*.

Les virus sont impliqués dans (5 – 10%) des cas ; il s'agit du virus respiratoire syncytial, du *parainfluenzae*, *influenzae* A et B et ceci essentiellement chez les enfants.

Les bactéries atypiques et les virus sont communément regroupés sous le nom «d'atypiques».

### IV.1 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

#### IV.1.1 Morbidité et mortalité dues aux infections respiratoires aiguës

Le nombre de décès dû aux infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde est estimé actuellement à 1.900.000/an. Les infections respiratoires aiguës sont les infections les plus fréquentes de l'enfant. Elles sont la cause de 30 à 40% des hospitalisations d'enfants.

Les pneumonies et broncho-pneumonies représentent 70 – 80% des admissions pour infections respiratoires aiguës.

### **IV.1.2 Transmission**

Les infections respiratoires aiguës sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires (malades, porteurs sains...).

## **IV.2 LES INFECTIONS RESPIRATOIRES BACTERIENNES**

### **IV.2.1 Les principales bactéries des infections aiguës des voies respiratoires**

Deux pathogènes sont majeurs :

- *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoques);
- *Haemophilus influenzae* (*haemophilus*).

Ce sont des commensaux habituels du rhinopharynx responsables d'infections respiratoires aiguës de bactériémies avec localisation préférentielle aux séreuses (méningites).

Ce sont des bactéries extracellulaires et résistantes à la phagocytose du fait de la présence d'une capsule qui joue un rôle déterminant dans la bactériémie.

Ils colonisent le tractus respiratoire, y adhèrent, se multiplient et favorisent la dissémination.

Les autres pathogènes étant : *Moraxella catarrhalis* qui vient en troisième position, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertusis*.

### *IV.2.1.1 Streptococcus pneumoniae*

#### ■ Caractères bactériologiques

##### ■ Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le pneumocoque présente un aspect de diplocoque en flamme de bougie, en "8" ou en courtes chaînettes, Gram positif. Les formes virulentes sont capsulées.

Cependant, l'aspect n'est pas toujours évocateur. Par exemple, si l'environnement est carencé en magnésium ou en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire, on peut observer des chaînettes relativement longues. Dans certains cas, si le malade est sous traitement, les pneumocoques peuvent prendre un aspect pseudo-bacillaire.

Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître Gram négatif.

La capsule est généralement visible dans les produits pathologiques, mais elle est parfois plus discrète, et particulièrement belle après inoculation à l'animal sensible (souris).

##### ■ Caractères cultureux

###### ● Milieux de culture

On utilise des milieux nutritifs riches comme par exemple la gélose au sang de mouton ou de cheval à 5%.

Ce milieu est rendu sélectif au pneumocoque par addition de gentamicine à la concentration de 6ug /ml [1].

Mais il a été démontré que le meilleur milieu pour l'isolement de *Streptococcus pneumoniae* est la gélose Wilkins chalgren au sang de cheval cuit +polyvitex car pouvant limiter les phénomènes d'auto stérilisation des cultures

grâce à la présence du pyruvate de sodium. Il permet d'obtenir également des colonies alpha-*viridans* spécifiques à l'espèce.

#### ● Conditions de culture

La culture du pneumocoque peut être réalisée à une température comprise entre 25 et 42°C et à des pH situés entre 6,5 et 8,3. En routine, on cultive le germe en 24 à 48 heures, entre 35 et 37°C. Le pH optimal est de 7,8.

Ce germe nécessite des conditions d'anaérobiose ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> à 5%.

#### ● Aspect macroscopique des colonies

Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5mm de diamètre. Ils développent une hémolyse de type alpha avec un verdissement du milieu, comme les streptocoques *viridans*.

Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse.

Les colonies ont un aspect muqueux lorsque la capsule est de grande taille. Des colonies rugueuses, d'aspect ridé, sont rarement observées ; elles sont formées par des souches non capsulées.

#### ■ Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de l'eau oxygénée responsable en partie de son autolyse.

La mise en évidence d'activités enzymatiques, de la fermentation de sucres et de la croissance en milieu hostile, à l'aide de microméthodes, permet l'identification de *Streptococcus pneumoniae* et le diagnostic différentiel avec d'autres espèces de streptocoques.

Les caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae* sont présentés dans le tableau I.

**Tableau VII : Caractères biochimiques de *Streptococcus pneumoniae***

Test	VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMI	GLY
Résultat	-	-	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	-	-	d

VP : réaction de Voges-Prokauer

RAF : Raffinose

**ADH : Arginine dihydrolase    SOS : Sorbose**

ESC : esculine

INU : Inuline

ARA : L-Arabinose

LAC : Lactose

BHS : bouillon hypersalé

RIB : Ribose

**MAN : Mannitol    AMI : Amidon**

**SOR : Sorbitol    GLY : Glycérol**

TRE : Tréhalose

(-) = Caractère négatif (0 – 25 % des souches)

(+) = Caractère positif (71 – 90 % des souches)

(d) = Caractère variable (26 – 70 % des souches).

### ▣ Identification formelle

L'identification formelle des pneumocoques repose sur trois critères :

- la sensibilité à l'optochine ;
- la lyse par la bile ;
- la mise en évidence d'une capsule.

L'inoculation à l'animal sensible permet également de mettre en évidence avec certitude *Streptococcus pneumoniae*.

#### ● Sensibilité à l'optochine (éthylhydrocupréine)

L'optochine est un dérivé proche de la quinine.

Des disques de 6 mm de diamètre sont chargés de 5µg d'optochine, dose calculée pour provoquer sur une culture de pneumocoque sur gélose au sang, une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 12 et 35 mm.

Les autres streptocoques sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque.

Cependant, 0,5 à 5% des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques *viridans* sont sensibles à l'optochine [51].

Il convient donc d'être nuancé et de tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition : la plupart des pneumocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont un diamètre d'inhibition supérieur à 15-20mm. Pour un diamètre inférieur à 15 mm, il est nécessaire de pratiquer des tests complémentaires.

#### ● La lyse par la bile ou phénomène de NEUFELD

A pH neutre, les pneumocoques provenant d'une culture en bouillon et mis en suspension dans de l'eau stérile, sont lysés par une solution de désoxycholate de sodium de 2 à 10%. La lyse se traduit par un éclaircissement du milieu en

quelques minutes. Selon les auteurs, 86 à 100% des pneumocoques sont lysés par la bile.

La sensibilité à l'optochine et la lyse par les sels biliaires sont spécifiques des pneumocoques et peuvent être utilisées pour les colonies en forme lisse. Pour les souches rugueuses (dépourvues de capsule), le seul test utilisable est la sensibilité à l'optochine.

### ● Mise en évidence de l'antigène capsulaire

Elle s'effectue à l'aide d'un sérum antipneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires. La réaction peut s'effectuer, soit à partir de cultures, soit à partir de produits pathologiques.

Il existe plusieurs méthodes :

- réaction du "gonflement capsulaire" ou réaction de NEUFELD. Cette technique est aussi la méthode de choix utilisée pour le sérotypage des pneumocoques.

- réactions d'agglutination :

- \* agglutination de particules de latex sensibilisés ;
- \* coagglutination (COA) avec des staphylocoques tués [13] ;
- \* contre-immuno-électrophorèse (CIE) [21].

### ● Inoculation à l'animal sensible

Les souris et les lapins sont hautement sensibles à l'infection par les pneumocoques. La méthode de choix utilise l'inoculation intrapéritonéale à une souris jeune (12 à 14g). Celle-ci meurt en 24-48 heures à la suite d'une péritonite aiguë et bactériémie.

Cependant, 5% des souris inoculées survivent pendant une période plus longue, et dans ce cas, il faut les sacrifier au plus tard 96 heures après l'infection.

Les pneumocoques sont ainsi isolés en culture pure dans l'hémoculture.

## ▣ Facteurs de virulence et pouvoir pathogène

### ● Le portage asymptomatique

Les pneumocoques sont des commensaux des voies respiratoires supérieures (nasopharynx) de l'homme et des animaux.

Le portage est inversement proportionnel à l'âge et au titre des anticorps anticapsulaires de l'hôte. Le statut immunitaire de l'hôte est aussi un facteur important dans la prévalence et la durée du portage [51].

### ● Facteurs de virulence

#### ✚ La capsule

La plupart des souches de *Streptococcus pneumoniae* possèdent des capsules recouvrant la paroi cellulaire et constituées de polysides spécifiques de type. Ainsi, 84 sérotypes de pneumocoques ont pu être identifiés.

La capsule a été reconnue depuis longtemps comme le facteur de virulence des pneumocoques. En effet, elle agit par diminution de l'opsonisation et de l'ingestion des pneumocoques par les cellules phagocytaires : en recouvrant les structures pariétales capables de fixer les fragments C3b du complément, elle empêche ces derniers de se fixer sur les récepteurs (CR1 et CR3) des cellules phagocytaires.

Les formes rugueuses ne possèdent pas de capsule ; elles ne sont pas virulentes.

#### ✚ La pneumolysine

Hémolysine intracellulaire libérée par autolyse, la pneumolysine est responsable de l'hémolyse alpha observée sur gélose au sang. Elle est élaborée par toutes les souches isolées de pneumocoques [14]. C'est une toxine thiol-activable, produite au cours des infections pneumococciques *in vivo*.

Sa pathogénicité et sa virulence ont été démontrées [9, 37].

Elle agit par deux modes d'action :

- par une activité toxique cellulaire liée à l'activation du complément [2]. Cette activation pourrait être associée à la libération de fragments anaphylactogènes (C3a et C5a) conduisant à l'influx, et à l'activation de polynucléaires sans capacité d'ingestion des pneumocoques ;
- par une modification de la fonction de certaines cellules du système immunitaire : phagocytes, lymphocytes T et B [51].

La pneumolysine provoque également une diminution des battements ciliaires des cellules épithéliales.

### **La protéine A de surface**

Elle est présente sur la majorité des souches de *Streptococcus pneumoniae*.

Le gène de cette protéine a été cloné, et l'injection des mutants entraîne une mortalité très retardée par rapport à celle des souches isogéniques sauvages.

La protéine A de surface lie le facteur H du système complémentaire, qui est une protéase active sur le composé C<sub>3</sub> du complément.

### **● Pouvoir pathogène naturel**

Les pneumocoques sont responsables d'infections très sévères à tous les âges, avec une incidence élevée chez les enfants de moins de deux ans et les sujets de plus de soixante ans.

### **Les pneumonies**

Elles surviennent dans la grande majorité des cas après inhalation des bactéries. Elles s'accompagnent de lésions tissulaires très importantes liées à la réponse inflammatoire dépendante des polynucléaires.

### **Les bactériémies et septicémies**

Elles sont souvent associées à des lésions tissulaires, en particulier pulmonaires. Cependant, elles peuvent exister en l'absence d'un foyer cliniquement patent. Elles sont toujours d'un mauvais facteur pronostic.

### **Les bronchites suppurées**

### **Les méningites**

Elles sont mortelles dans 10 à 30% des cas.

### **Les infections ORL**

Ce sont les otites et sinusites de gravité et d'évolution diverses en fonction de l'âge et du terrain.

### **Les autres localisations**

- Péritonites primitives ou favorisées par le port d'un dispositif intra-utérin ;
- Endocardites et péricardites ;
- Arthrites.

#### IV.2.1.2 *Haemophilus influenzae*

##### ■ Caractères bactériologiques

###### ■ Caractères morphologiques [7, 8,12]

*Haemophilus influenzae* est un bacille à Gram négatif, polymorphe, pouvant se présenter sous forme de coccobacilles. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative.

###### ■ Caractères culturaux

*Haemophilus influenzae* aimant le sang, elle ne pousse que sur gélose au sang. L'espèce *Haemophilus influenzae* présente des exigences en facteurs X et V qui sont tous les deux apportés par le sang cuit (15 minutes à 75 - 80°C). Le germe pousse donc sur gélose au sang cuit à la température de 35 à 37°C.

Le meilleur milieu retenu a été celui de Wilkins chalgren au sang de cheval cuit +1% de polyvitex.

###### ■ Caractères biochimiques

*Haemophilus influenzae* possède une oxydase, une nitrate réductase, une uréase et produit de l'indole.

En effet, huit biotypes ont été définis pour l'espèce, à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activités enzymatiques (uréase et ornithine décarboxylase).

Le biotypage se fait à l'aide de milieux usuels supplémentés ou de microméthode (API – NH) avec un inoculum lourd.

**Tableau VIII : Caractères biochimiques d'*Haemophilus influenzae* [29]**

Test	Résultats
Synthèses porphyrines	-
Exigences en facteur V	+
Hémolyse	-
D-glucose	+
D-fructose	-
d-xylose	+
d-ribose	+
d-mannose	-
d-galactose	+
Maltose	+
Mélibiose	-
Tréhalose	-
Raffinose	-
SH <sub>2</sub>	-
Hémagglutination	-
Besoin CO <sub>2</sub>	-
Phosphatase alcaline	+
Saccharose	-
Lactose	-

(-) = caractère négatif des souches

(+) = caractère positif des souches

## ● Facteurs de virulence [75, 92]

Plusieurs facteurs font que *Haemophilus influenzae* accuse des infections sévères décrites à tous les âges (pneumonies, otites, sinusites, méningites ...).

### + La capsule

Elle est présente chez certaines souches encapsulées. La grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningite, épiglottite, arthrite, septicémie) est due aux souches encapsulées de type B, résistantes à la phagocytose et à l'action lytique du complément.

Les infections de la sphère ORL, par contre, sont dues aux souches non capsulées appartenant aux autres sérotypes (a, c, d, e, f).

### + Pili ou fimbriae

Ils participent à l'adhésion de la bactérie à la muqueuse nasopharyngée. Leur rôle apparaît surtout dans la phase initiale de la colonisation.

### + Les protéines membranaires

Les protéines *HMW1* et *HMW2* sont identifiées comme des facteurs d'adhésion.

Les protéines de membrane externe (PEM) représentent des facteurs de virulence, surtout chez les souches non capsulées d'*Haemophilus influenzae* ; elles sont très immunogènes. Elles sont hétérogènes et leurs sérotypes sont utiles en épidémiologie.

### + Les lipoligosaccharides

Leur lyse entraîne la libération de lipide A, qui possède une activité endotoxinique.

○ **Immunoglobine A protéase**

C'est une enzyme sécrétée par la bactérie. Elle empêche la production d'Immunoglobuline A sécrétoire, entraînant ainsi la propagation de l'inflammation.

***IV.2.1.3 Moraxella catarrhalis***

■ **Caractères bactériologiques**

▣ **Caractères morphologiques [15]**

*Moraxella* se présente sous forme de diplocoques à Gram négatif. Elle est aérobie stricte.

▣ **Caractères cultureux**

*Moraxella catarrhalis* pousse sur gélose au sang cuit supplémentée (polyvitex<sup>®</sup>, Isovilatex<sup>®</sup>) à la température de 35 à 37°C, pendant 18 à 24 heures.

Néanmoins il a été démontré que le Wilkins chalgren au sang de cheval cuit donnait de meilleurs résultats.

Toutefois, les souches de *Moraxella catarrhalis* peuvent tolérer des températures plus basses : elles poussent bien à 28°C.

Les colonies de *Moraxella catarrhalis* apparaissent rosâtres à marron, opaques, de consistance friable, avec une surface rugueuse.

▣ **Caractères biochimiques**

*Moraxella catarrhalis* respire les nitrates en anaérobiose. Il possède un cytochrome oxydase et une catalase.

*Moraxella catarrhalis* n'acidifie pas les sucres ; ceci est un critère essentiel pour le diagnostic différentiel avec *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*.

**Tableau IX : Caractères biochimiques de *Moraxella catarrhalis* [85]**

Oxydase	Catalase	Hydrolyse de :				Synthèse de poly-saccharides	ONPG	Réduction de		ADN	Hydrolyse	pigment
		Glu	Mal	Fru	Sac			NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>			
+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

(-) : réaction négative

(+) : réaction positive

Glu : glucose

Mal : maltose

Fru : fructose

Sac : saccharose

ONPG : O-nitrophényl-bêta-D galactopyranoside

NO<sub>3</sub> : nitrite

NO<sub>2</sub> : nitrate

ADN : acide désoxyribonucléique

### ● Facteurs de virulence

Les mécanismes par lesquels *Moraxella catarrhalis* entraîne des infections restent inconnus. Pour le moment, il n'a pas été mis en évidence de facteurs de virulence.

Mais la survenue d'infections nécessite plusieurs étapes :

- l'adhésion bactérienne grâce à la présence de Pili ;
- la colonisation et l'invasion de la muqueuse ;
- l'apparition de manifestations cliniques signant une multiplication importante des bactéries au niveau du site infectieux.

De plus, producteur de bêta-lactamases, *Moraxella catarrhalis* protégerait d'autres pathogènes de l'action des antibiotiques (bêta-lactamines), entraînant la prolongation de l'infection et la sélection de souches résistantes, malgré un traitement à priori suffisant.

## **IV.2.2 Les autres bactéries responsables d'infections respiratoires**

### ■ *Mycoplasma et Chlamydia*

Ce sont deux genres différents qui méritent d'être étudiés ensemble car leur pouvoir pathogène est similaire et ils requièrent le même type d'antibiothérapie.

L'inefficacité des bêta-lactamines qui sont les antibiotiques de référence pour les autres pathogènes respiratoires nécessite l'utilisation des cyclines ou des macrolides.

#### ***IV.2.2.1 Chlamydia psitacci***

Ce sont des bactéries intracellulaires strictes.

Il existe deux espèces à tropisme respiratoire :

- *Chlamydia pneumoniae* qui est strictement humain;
- *Chlamydia psittaci*

#### ***IV.2.2.2 Mycoplasma pneumoniae***

Ce sont des bactéries sans paroi, vivant en contact étroit avec les cellules. Une espèce à tropisme respiratoire et strictement humaine : *Mycoplasma pneumoniae*.

### **IV.3 LES INFECTIONS RESPIRATOIRES VIRALES**

Les infections respiratoires virales représentent environ 80% des causes d'infections respiratoires aiguës.

La gravité d'une infection virale est fonction du virus respiratoire et d'une susceptibilité individuelle des agents de surinfection.

Les bactéries sont surtout des agents de surinfection.

Les virus plus rarement retrouvés sont : HSV qui présentent des récurrences très fréquentes et qui sont difficilement imputables.

CMB difficilement imputable

RBV presque jamais retrouvé.

Ces virus peuvent provoquer des manifestations respiratoires associées à d'autres manifestations cliniques.

**Tableau X : Virus responsables des infections respiratoires**

	<b>VI</b>	<b>VPI</b>	<b>VRS</b>	<b>AdV</b>	<b>RV</b>	<b>Coronavirus</b>
<b>Famille</b>	Orthomyxo- viridae	Paramyxo- viridae	Paramyxo- viridae	Adeno- viridae	Picornaviridae	Corona- viridae
<b>Caractéristiques</b>	ARN Simple brin gén.segmenté enveloppé	ARN simple brin enveloppé	ARN simple brin enveloppé	AND  Non enveloppé	ARN simple brin  Non enveloppé	ARN simple brin enveloppé
<b>Pathogénicité</b>	Syndrome grippal	1.2 : laryngite 3 : bronchiole	Bronchioles Rhumes	Pharyngites B.pneumonies	30-50% des rhumes	rhume
<b>Epidémiologie</b>	Pandémies et épidémies Hiver	Variable	Très répandu Hiver	Répandu toute l'année	Surtout enfants Automne – hiver	Répandu Fin automne
<b>Mode de transmission</b>	Direct ou indirect	Direct ou indirect	Direct ou indirect	Direct ou indirect	Direct ou indirect	Direct ou indirect
<b>Incubation</b>	1-4 jours	4-5 jours	4-5 jours	3-10 jours	2-4 jours	2-5 jours
<b>Transmission</b>	3-5 j suivant le début clinique		Plusieurs semaines	Au cours de la phase aiguë	5 j après le début clinique	Convalescence
<b>Cultures Cellules Délai</b>	MDCK 2-3 jours	L LCMK2 3-12 jours	MRC5-Hep 2 6-10 jours	Hep 2, MRC5 1-2 jours	MRC5 7-22 jours	Culture très difficile
<b>Recherche d'Ag</b>	IF, IC ELISA, EIA sur membrane	I C, IF	IF, IC ELISA, EIA sur membrane	IF, IC ELISA, I.peroxydase	Non faite	Rarement faite

## **I - MATERIEL D'ETUDE**

### **I.1 CADRE D'ETUDE**

Ce travail a été réalisé à l'unité de recherche et de biotechnologie bactérienne du laboratoire de bactériologie-virologie du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec (HALD).

### **I.2 MATERIEL**

#### **I.2.1 Souches bactériennes**

Les souches de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, ont été collectées au niveau du laboratoire de l'Hôpital Universitaire Aristide Le Dantec (HALD) de l'année 1994 à 2003.

Elles ont toutes été prélevées chez des patients souffrant d'infections respiratoires aiguës (otites, sinusites, rhinopharyngites, angines, bronchites, pneumonies).

#### **I.2.2 Souches de référence**

- *Haemophilus influenzae* ATCC 49 247
- *Haemophilus influenzae* type b ATCC 49 766
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49 619
- *Escherichia coli* ATCC 35 218

#### **I.2.3 Les antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés sont :

- Pénicilline
- Ampicilline
- Amoxicilline
- Amoxicilline + acide clavulanique
- Cetriaxone

- Oxacilline
- Érythromycine
- Clindamycine
- Télithromycine
- Pristinamycine
- Spiramycine
- Céfotaxime

#### **I.2.4 Matériel et réactifs utilisés pour l'antibiogramme standard et le E-test**

- Disques d'antibiotiques
- Antibiotiques en poudre
- Solvant et diluant appropriés selon l'antibiotique
- Pincés
- Bandelettes E-test
- Inoculateur multipoint
- Boîtes de Pétri
- Gélose Columbia sans ou avec sang cuit
- Gélose MH (Muëller – Hinton)
- Hémoglobine base autoclavée
- Sang de cheval défibriné
- Polyvitex
- Eau physiologique
- Eau distillée stérile
- Pipettes graduées (1ml et 10ml)
- Tube à hémolyse stérile
- Tubes à échelle Mac Farland (0,5 - 1)

## II - METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX MACROLIDES ET AUX BETA-LACTAMINES

La détermination de la sensibilité a été basée sur la recherche des diamètres d'inhibition et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Deux méthodes ont été utilisées :

- l'antibiogramme standard;
- Epsillometer-test (E-test)

### II.1 DETERMINATION DES DIAMETRES D'INHIBITION : ANTIBIOGRAMME STANDARD PAR METHODE DES DISQUES

#### II.1.1 Principe

L'antibiogramme standard est une méthode qui utilise la technique de la diffusion en milieu gélosé.

Il permet d'apprécier la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence de l'antibiotique testé.

#### II.1.2 Mode opératoire

##### *Préparation de l'inoculum*

L'inoculum est préparé en réalisant une suspension d'une ou de deux colonies obtenues à partir d'une culture jeune (15 à 24 heures).

La suspension est préparée à partir de 10ml d'eau physiologique de manière à obtenir une turbidité équivalente à celle du tube 0,5 de la gamme de Mac Farland.

##### *Ensemencement et application des disques*

Il a été réalisé par écouvillonnage. Les géloses utilisées ont été choisies en fonction des exigences des espèces à tester : GSC pour *Streptococcus pneumoniae* GSC polyvitex pour *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*.

Les boîtes ont été incubées à 37°C sous CO<sub>2</sub> (5 à 10%) pendant 18 à 24 heures.

Les disques d'antibiotique ont été appliqués sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince en appuyant légèrement.

### **II.1.3 Lecture et interprétation**

Les diamètres d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle à coulisse, puis comparés aux valeurs critiques de l'antibiotique correspondant.

En fonction du diamètre de la zone d'inhibition, le germe est dit sensible, intermédiaire ou résistant.

**Tableau XI : Critères d'interprétation des diamètres d'inhibition proposés pour *Streptococcus pneumoniae* selon les normes NCCLS**

Antibiotiques	Charge disque	Diamètres (mm)		
		R	I	S
Oxacilline	1µg	<13	14-16	>17
Spiramycine	100µg	≤15	16-22	≥23
Pristinamycine	15µg-	-	-	≥18
Télithromycine	15µg	<16	17-20	>21

**Tableau XII : critères d'interprétation des diamètres d'inhibition proposés pour *Haemophilus influenzae* selon les normes NCCLS**

Antibiotiques	Charge disque	Diamètres (mm)		
		R	I	S
ampicilline	2µg	<17	-	>18
Spiramycine	100µg	≤15	16-22	≥23
Pristinamycine	15µg	-	-	≥18

**Tableau XIII : Critères d'interprétation des diamètres d'inhibition proposés pour *Moraxella catarrhalis* selon les normes NCCLS**

Antibiotiques	Charge disque	Diamètres (mm)		
		R	I	S
Pénicilline G	1µg	≤19	20-27	≥28
Spiramycine	100µg	≤15	16-22	≥23
Pristinamycine	15µg	-	-	≥18
Erythromycine	5µg	≤27	-	≥28

**Tableau XIV : Critères d'interprétation des diamètres d'inhibition proposés pour *Escherichia coli* selon les normes NCCLS**

Antibiotiques	Charge disque	Diamètres (mm)		
		R	I	S
Amoxicilline/ acide clavulanique	20/10µg	≤17	-	≥22

## II.2 DETERMINATION DE LA CMI PAR E-TEST (EPSILLOMETER-TEST)

### II.2.1 Principe

Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de dilution et de diffusion en milieu gélosé. C'est une technique de détermination directe de la CMI.

La technique consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la souche bactérienne, des bandelettes inertes de 50mm de long et 5mm de large, calibrées par un gradient de concentrations de l'antibiotique, couvrant une zone de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32 mg/l.

L'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

Une échelle de lecture imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une interprétation rapide.

## **II.2.2 Réalisation de la technique E-test**

### **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies viables obtenues à partir d'une culture pure dans un bouillon MH (Streptocoques, Moraxelles) ou dans de l'eau physiologique (*Haemophilus influenzae*); la suspension a été calibrée à l'échelle 0,5 Mac Farland.

### **Ensemencement**

Le E-test se fait de préférence dans des boites de Pétri.

Les géloses utilisées ont été choisies en fonction des exigences de chaque germe. L'ensemencement a été fait par écouvillonnage.

### **Application des bandes E-test**

Les antibiotiques testés par E-test diffèrent selon les germes :

- sortir le paquet de bandelettes E-test du freezer et le laisser quelques minutes à la température ambiante avant de l'ouvrir ;
- vérifier s'il y a ni fente ni trou (ne pas l'utiliser en cas de dommage) ;
- retirer les bandes avec une pince par la partie supérieure où il est marqué E (éviter de toucher les zones chargées avec la main);
- déposer les bandelettes à la surface de la gélose en évitant de déplacer les bandes car l'antibiotique diffuse dans le milieu en quelques secondes.
- Incuber les cultures à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 à 48 heures.

### **II.2.3 Lecture et interprétation**

Après 24 heures d'incubation, on a vu apparaître une ellipse traduisant l'inhibition de la croissance, dont les points d'intersection avec la bandelette déterminent la CMI.

Une échelle de lecture imprimée sur la bandelette a permis une interprétation rapide.

Pour les zones d'inhibition nettes et symétriques la lecture ne pose pas problème.

Dans tous les cas une interprétation est nécessaire.

Une zone de décrochage (dip) dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse.

La présence de colonies « squatter » doit être analysée (résistance hétérogène, émergence de mutants résistants, mélange bactérien).

La présence d'une croissance en ligne le long de la bandelette n'est pas prise en compte et résulte certainement d'un séchage insuffisant de la surface du milieu.

### **II.2.4 Critères d'interprétation**

#### **■ Calcul des $CMI_{50}$ et $CMI_{90}$**

C'est la détermination de la médiane par la méthode d'extrapolation linéaire.

Les  $CMI_{50}$  et les  $CMI_{90}$  sont données par la formule suivante :

$$X = \frac{A - B}{C - B} (Z - Y) + Y$$

Si  $X = CMI_{50}$

$A$  = moitié des colonies inhibées

**B** = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à **A**

**C** = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à **A**

**B** < **A** < **C**

**Y** = CMI de **B**

**Z** = CMI de **C**

Si **X** = **CMI**<sub>90</sub>

**A** = 90% des souches inhibées

**B** = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à **A**

**C** = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à **A**

**B** < **A** < **C**

**Y** = CMI de **B**

**Z** = CMI de **C**

### **II.3 CONTROLE DE QUALITE DES TESTS DE SENSIBILITE**

Les normes utilisées ont été celles de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory) qui permettent d'obtenir des souches de contrôle de qualité de source pure ATCC (American Type Culture Collection) et d'entretenir correctement les souches de contrôle de qualité en les conservant selon deux méthodes :

- en stock culture pour l'utilisation fréquente des souches;
- en -70°C dans des cryotubes avec des billes, ce qui permet un stockage de longue durée.

Dans toutes les séries de détermination de la sensibilité, ces souches ont été testées en parallèle pour le contrôle de qualité afin de valider les tests. Leurs résultats ont été lus en premier lieu.

Des contrôles de qualité ont été effectués à plusieurs niveaux :

- une vérification de la date de préférence de péremption des produits et de tout réactif à utiliser;
- un stockage correct des souches de référence, des milieux de culture et des disques par un relevé quotidien de la température du réfrigérateur.;
- une manipulation correcte avec respect des normes du protocole;
- une vérification des normes de culture en respectant la profondeur de la gélose 4 à 5 mm, respect des exigences nutritives des souches bactériennes et de la capacité de croissance supportée par les différents milieux.

## **II.4 ANALYSE DES DONNEES : UTILISATION DU LOGICIEL WHONET V**

Le logiciel Whonet V a servi à l'analyse des résultats.

### **II.4.1. Définition**

Le logiciel Whonet (World Health Organisation Network) est une série de programmes informatiques qui facilite la gestion des résultats des tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Il permet d'avoir sous forme de pourcentage et courbes (diagrammes) les résultats de sensibilité des souches bactériennes par rapport à différents antibiotiques en fonction des différents paramètres.

### **II.4.2 Méthode**

Les différentes valeurs des CMI et des diamètres d'inhibition pour chaque souche testée ont été au préalable enregistrées dans l'ordinateur avant l'exploitation.

Ces valeurs sont par la suite corrigées par le logiciel Whonet V.

## **III - RESULTATS**

### **III.1 LES SOUCHES BACTÉRIENNES**

Nous avons eu à travailler au total sur 389 souches bactériennes dont 297 souches de *Streptococcus pneumoniae*, 72 souches d'*Haemophilus influenzae* non capsulés, 14 souches d'*Haemophilus influenzae* type b et 6 *Moraxella catarrhalis*.

Toutes ces souches ont été isolées d'infections respiratoires selon divers prélèvements excepté celui du liquide céphalo-rachidien.

### **III.2 RÉSULTATS DE LA SENSIBILITÉ AUX BÊTA-LACTAMINES, MACROLIDES ET APPARENTÉS**

Des antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines et des macrolides ont été testés sur les souches de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* type b et *Moraxella catarrhalis* et tout ceci en vue de déterminer leur sensibilité et d'établir leur profil de résistance.

La détermination de la sensibilité a été réalisée par la méthode des disques ou antibiogramme standard et la méthode E-test.

### III.2.1 Résultats de la sensibilité des souches de *S. pneumoniae*

#### III.2.1.1 *Antibiogramme standard*

**Tableau XV : Sensibilité des souches de *Streptococcus pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines et macrolides apparentés par la technique de l'antibiogramme standard**

Antibiotiques	Nombre de souches testées	R		I		S	
		nombre	%	nombre	%	nombre	%
Oxacilline	297	98	33	0	0	199	67
Spiramycine	20	1	5	2	10	17	85
Pristinamycine	20	3	15	0	0	17	85
Télithrimycine	51	0	0	0	0	51	100

Globalement, les tests utilisés ont révélé des souches de pneumocoques qui présentaient une assez bonne sensibilité aux antibiotiques testés. Néanmoins, une certaine résistance a été observée.

Le test à l'oxacilline 1 $\mu$ g a montré 33% de résistance à la Pénicilline G avec des diamètres d'inhibition < 19mm. 15,82% des pneumocoques ont eu une résistance franche (PRP) et 17,18% une sensibilité diminuée faisant d'eux des PSDP.

La pénicilline G a été active sur 67% des souches.

Il en est de même pour la spiramycine et la pristinamycine qui ont été actives sur les PSP et PSDP avec des pourcentages de sensibilité de 85% pour chacune des deux.

Cinq pour cent des pneumocoques ont été résistants à la spiramycine et 10% ont eu une sensibilité diminuée.

Quinze pour cent des souches ont aussi été insensibles à la Pristinamycine.

L'activité de la Télithromycine a été très bonne, 100% de sensibilité. Aucune souche n'a été résistante.

*III.2.1.2 E-test*

**Tableau XVI : Sensibilité des souches de *Streptococcus pneumoniae* aux  $\beta$  lactamines, macrolides et apparentés par la méthode E-test**

Antibiotiques	Critères d'interprétation	Nombre de souches testées	R		I		S		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
			nombre	%	nombre	%	nombre	%		
Amoxicilline	S $\leq$ 2 R $\geq$ 8	150	7	4,7	0	0	143	95,3	0,032	0,5
Amox/clav	S $\leq$ 2 R $\geq$ 8	115	7	6,1	1	0,9	107	93	0,016	0,025
Cefotaxime	S $\leq$ 0,5 R $\geq$ 1	129	27	20,9	0	0	102	79,1	0,064	1
Ceftriaxone	S $\leq$ 0,5 R $\geq$ 1	18	2	11,1	0	0	16	88,9	0,023	1,5
Erythromycine	S $\leq$ 0,25 R $\geq$ 1	126	15	11,9	0	0	111	88,1	0,094	2
Clindamycine	S $\leq$ 0,25 R $\geq$ 1	15	0	0	2	13,3	13	86,7	0,125	0,38

Les pneumocoques se sont montrés majoritairement sensibles à l'amoxicilline 95,3% et à l'association amoxicilline / acide clavulanique 93%. Seuls 4,7% et 6,1% des souches ont été respectivement résistantes à ces deux antibiotiques et ceci à des CMI relativement basses : CMI90 = 0,5mg/ml pour le premier et CMI90 = 0,025mg/ml pour le deuxième.

Une sensibilité diminuée à l'amoxicilline / acide clavulanique a été retrouvée chez une souche. Toutes ces résistances ont été retrouvées chez les PRP.

Pour ce qui est des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, leur activité a été assez bonne. Elles ont été actives sur les PSP et PSDP.

Toutefois, l'activité de la Ceftriaxone a été meilleure que celle de la Cefotaxime avec 11,1% de résistance à des CMI90 = 1mg/ml contre 20,9% de résistance à des CMI90 de 1,5mg/ml.

L'érythromycine a été d'une bonne activité sur les souches PSP et les PSDP. Toutes les résistances (11,9%) ont été observées sur les souches PRP à des CMI plutôt élevées CM90 = 2mg/ml.

Les pneumocoques ont été dans l'ensemble sensibles à la clindamycine à un taux de 86,7%. Cependant, nous avons noté une sensibilité diminuée chez 2 souches de PRP correspondant à 13,3%.

**Tableau XVII : Profil de résistance des souches de *Streptococcus pneumoniae***

<b>Souches</b> <b>ATB</b>	<b>PSP (67%)</b> <b>N=199</b>	<b>PSDP (17,18%)</b> <b>N=51</b>	<b>PRP(15,82%)</b> <b>N=47</b>
Amoxicilline	S	S	R(14,89%)
Amox / Clav	S	S	(2,13%) r ou R (17,02%)
Cefotaxime	S	S	R (57,45%)
Ceftriaxone	S	S	R (4,26%)
Erythromycine	S	S	R (31,91%)
Spiramycine	S	S	(4,25%) r ou R (2,13%)
Clindamycine	S	S	R (4,26%)
Pristinamycine	S	S	R (6,38%)
Télithromycine	S	S	S

**Tableau XVIII : Mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines,  
Macrolides et apparentés chez *Streptococcus pneumoniae***

Phénotypes	Génotypes
PENI G	Modifications des PLP <sub>S</sub> 1a 2x 2b
Peni G	Modifications des PLP <sub>S</sub> 2x 2b
AMX	Modifications des PLP <sub>S</sub> 2b
CSP III <sup>e</sup> G	Modifications des PLP <sub>S</sub> 1a et 2x
ERY (MLS <sub>B</sub> )	ermB ermA rrl(domaine V de la 23S de l'ARN <sub>r</sub> )
SPI (M)	srm B
Ery (M)	mef A
ERY-Cli (ML Bas niveau)	rrl (domaine V de la 23S de l'ARN <sub>r</sub> )
Spi PRI (MS)	Rplv (protéine L <sub>22</sub> )

### **III.2.2 Résultats de la sensibilité des souches de *Haemophilus influenzae***

#### ***III.2.2.1 Antibiogramme standard***

**Tableau XIX : Sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* aux  $\beta$ -lactamines macrolides apparentés par la technique de l'antibiogramme standard**

Antibiotiques	Nombre de souches testées	R		I		S	
		nombre	%	nombre	%	nombre	%
Ampicilline	72	64	88,89	0	0	8	11,11
Spiramycine	20	11	55	1	5	8	40
Pristinamycine	12	8	66,7	0	0	4	33,3

L'activité de l'ampicilline est en dessous de la moyenne car sur les 20 souches  $\beta$ -lactamases négatives seuls 8 ont été sensibles à l'ampicilline ce qui correspond à 11,11% du total des *Haemophilus*.

Il a été inactif sur l'ensemble des souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

La spiramycine n'a pas été d'une bonne activité 40%. Les taux de résistance et de sensibilité intermédiaire ont été respectivement 55% et 5% sur les souches insensibles à l'ampicilline.

Nous avons obtenu un pourcentage de résistance à la Pristinamycine égal à 66,7%. Cependant 33,3% des souches ont été sensibles à cette molécule.

*III.2.2.2 E- test*

**Tableau XX : Sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* aux  $\beta$  lactamines macrolides et apparentés par la méthode E-test**

Antibiotiques	Critères d'interprétation	Nombre de souches testées	R		I		S		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
			nombre	%	nombre	%	nombre	%		
Amoxicilline	S $\leq$ 4 R $\geq$ 16	57	1	1,8	0	0	56	98,2	0,5	1
Amox/clav	S $\leq$ 4 R $\geq$ 8	72	2	2,8	0	0	70	97,2	0,38	0,75
Cefotaxime	S $\leq$ 2 R $\geq$ 4	61	6	9,8	1	1,6	54	88,5	0,5	3
Erythromycine	S $\leq$ 0,5 R $\geq$ 8	45	20	44,4	13	28,9	12	26,7	4	8

Dans notre étude, les souches ont été d'une grande sensibilité à l'amoxicilline 98,2%. La seule résistance obtenue a été observée sur une souche BLNAR à une CMI<sub>90</sub> = 1mg/ml.

De même, pour l'association amoxicilline / acide clavulanique, les résistances concernent 2 souches non productrices de Béta-lactamases BLNAR.

La Cefotaxime a révélé une résistance sur 9,8% des souches à des CMI assez élevées CMI<sub>90</sub> = 3 mg/ml.

Elle a été d'une bonne activité sur les *Haemophilus*, 88,5% de sensibilité observée chez les souches AMPIS et AMPIR/BL+.

Les *Haemophilus* ont été dans l'ensemble peu sensibles aux macrolides. 44,4% des souches ont été résistantes à l'érythromycine et 28,9% ont été de sensibilité diminuée, ceci à des CMI élevées CMI<sub>90</sub> = 8 mg/ml.

Cette résistance a été observée chez les souches AMPI R.

**Tableau XXI : Profil de résistance des souches d'*Haemophilus influenzae***

<b>Souches</b> <b>ATB</b>	<b>Ampi S</b> <b>n=8</b> <b>(11,11%)</b>	<b>Ampi R/ BL +</b> <b>n=52</b> <b>(72 ,22%)</b>	<b>Ampi R/ BL -</b> <b>n=12</b> <b>(16,67%)</b>
Amoxicilline	S	S	R (8,33%)
Amox / Clav	S	S	R (16,66%)
Cefotaxime	S	S	(8,33%) r ou R (50%)
Erythromycine	S	(19,23%) r ou R (30,77%)	(25%) r ou R (33,33%)
Spiramycine	S	(1,92%) r ou R (19,23%)	R (8,33%)
Pristinamycine	S	R (13,46%)	R (8,33%)

### **III.2.3 Résultats de la sensibilité des souches de *Haemophilus influenzae* type b**

#### **III.2.3.1 Antibiogramme standard**

**Tableau XXII : Sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* type b aux  $\beta$ -lactamines macrolides apparentés par la technique de l'antibiogramme standard**

Antibiotiques	Nombre de souches testées	R		I		S	
		nombre	%	nombre	%	nombre	%
Ampicilline	14	12	85,71	0	0	2	14,29
Spiramycine	14	11	78,57	1	7,14	2	14,29
Pristinamycine	13	10	76,9	0	0	3	23,1

La plupart des souches d'Hib ont été résistantes à l'ampicilline 85,71% dont 28,57% chez les souches non productrices de bêta-lactamases : n les appelle BLNAR et 57,14% chez les souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

La Spiramycine n'a été active que sur 2 souches (14,29%). Sur les 12 souches restantes 11 ont été résistantes dont les 3 souches BLNAR et une souche intermédiaire BLNAR également.

Soixante seize virgule neuf pour cent des Hib ont été résistantes à la Pristinamycine et les 23,1% ont toutes été sensibles.

Ces résistances ont été observées sur les souches BLNAR et AMPIR/BL+.

### III.2.3.2 E-test

**Tableau XXIII : Sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* type b aux  $\beta$  lactamines, macrolides et apparentés par la méthode E-test**

Antibiotiques	Critères d'interprétation		Nombre de souches testées	R		I		S		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
				nombre	%	nombre	%	nombre	%		
Amoxicilline	S $\leq$ 2	R $\geq$ 16	14	2	14,3	0	0	12	85,7	1	32
Amox/clav	S $\leq$ 4	R $\geq$ 8	14	0	0	0	0	14	100	0,5	1,5
Cefotaxime	S $\leq$ 2	R $\geq$ 4	14	0	0	0	0	14	100	0,032	0,094

**Tableau XXIV : Profil de résistance des souches d'*Haemophilus influenzae* type b**

ATB \ Souches	Ampi S		Ampi R/ BL -		Ampi R/ BL+	
	N=2	(14,29%)	N=8	(57,14%)	N=4	(28,57%)
Amoxicilline	S		S		R (14,29%)	
Amox / Clav	S		S		S	
Cefotaxime	S		S		S	
Spiramycine	S		R (100%)		(25%)r ou R (75%)	
Pristinamycine	S		R (100%)		R (50%)	

**Tableau XXV : Mécanismes de résistances aux bêta-lactamines, macrolides et apparentés chez *haemophilus influenzae***

Phénotypes	Génotypes
AMPIR/BL <sup>+</sup>	TEM <sub>1</sub>
AMPIR/BL <sup>-</sup>	Modification PLP 3 A et/ou 3 B (fts I)
M (ERY ou ery)	Efflux Acr AB
MS (Spi – PRI) (SPI – PRI)	Mutation ribosomale L <sub>22</sub>

### III.2.4 Résultats de la sensibilité des souches de *Moraxella catarrhalis*

#### III.2.4.1 Antibiogramme standard

**Tableau XXVI : Sensibilité des souches de *Moraxella catarrhalis* aux  $\beta$ -lactamines macrolides apparentés par la technique de l'antibiogramme standard**

Antibiotiques	Nombre de souches testées	R		I		S	
		nombre	%	nombre	%	nombre	%
Pénicilline G	6	4	66,67	0	0	2	33,33
Erythromycine	6	0	0	0	0	6	100
Spiramycine	6	0	0	0	0	6	100
Pristinamycine	6	0	0	0	0	6	100

L'activité de la Pénicilline G a été totale sur les souches non productrices de Bêta-lactamases. Cependant, elle est restée inactive sur les souches BL+.

L'érythromycine et la spiramycine ont été d'une très bonne activité, 100% des souches ont été sensibles.

Toutes les souches ont été également sensibles à la Pristinamycine.

### III.2.4.2 E-test

**Tableau XXVII : Sensibilité des souches de *Moraxella catarrhalis* aux  $\beta$  lactamines macrolides et apparentés par la méthode E-test**

Antibiotiques	Critères d'interprétation	Nombre de souches testées	R		I		S		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
			nombre	%	nombre	%	nombre	%		
Amoxicilline	S $\leq$ 4    R $\geq$ 16	6	0	0	0	0	6	100	2	48
Amox/clav	S $\leq$ 8    R $\geq$ 32	6	0	0	0	0	6	100	0,064	0,5
Cefotaxime	S $\leq$ 8    R $\geq$ 64	6	0	0	0	0	6	100	0,5	1

Les Moraxelles ont été sensibles à 100% à tous les autres bêta-lactamines testés à savoir l'amoxicilline, l'amox-clav et la Cefotaxime.

**Tableau XXVIII : Profil de résistance des souches de *Moraxella catarrhalis***

<b>ATB</b> \ <b>Souches</b>	<b>BL+</b> <b>N=4</b> <b>(66,67%)</b>	<b>BL-</b> <b>N=2</b> <b>(33,33%)</b>
Pénicilline G	R	S
Amoxicilline	S	S
Amox / Clav	S	S
Cefotaxime	S	S
Erythromycine	S	S
Spiramycine	S	S
Pristinamycine	S	S

## IV - DISCUSSION

*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* sont les 3 agents majeurs responsables des infections respiratoires. L'objet de notre travail a été la détermination des profils de résistance des bactéries citées ci-haut aux antibiotiques testés, à savoir certains des Bêta-lactamines et des macrolides mais également de prédire le déterminisme génétique qui est à l'origine.

Pour ce qui est de la résistance, deux méthodes ont été utilisées :

- l'antibiogramme standard : c'est la méthode la plus utilisée par les laboratoires de diagnostic. Elle est utilisée en routine car sa réalisation est simple. Lorsque la technique est parfaitement standardisée les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

Le milieu de culture choisi pour la croissance des pneumocoques est le MH (Müller - Hinton) enrichi de 5% de sang de mouton.

Pour *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*, le milieu utilisé a été la gélose chocolat polyvitex ®.

Mais il faut préciser qu'il a été démontré que le meilleur milieu pour l'isolement de ces trois germes est le Wilkins Chalgren, mais seulement son coût est élevé.

Une épaisseur de 4mm a permis une meilleure diffusion de l'antibiotique.

Toutes les précautions ont été prises depuis le stockage jusqu'à l'utilisation des disques.

- le E-test, technique rapide et simple, a permis d'avoir une estimation directe de la CMI. C'est la méthode de référence grâce à laquelle nous avons pu tester pour un germe donné plusieurs antibiotiques à la fois [20].

Après détermination des résistances, nous avons établi les phénotypes pour chaque bactérie afin de pouvoir donner leurs origines.

La plupart des résistances bactériennes provient des modifications de leurs gènes. Les bases génétiques de la résistance jouent un rôle-clé en déterminant le développement et la propagation de cette résistance.

#### **IV.1 RESISTANCE DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

La résistance aux antibiotiques des pneumocoques pose de nos jours un grand problème mondial et atteint de hauts niveaux dans certains pays [3,38, 52, 89].

##### **IV.1.1 Résistance aux bêta-lactamines**

###### ***IV.1.1.1 Pourcentages de résistance***

La résistance à la pénicilline a remarquablement augmenté durant ces dernières années.

Dans notre étude, 33% des pneumocoques ont été non sensibles à la Pénicilline G (PNSP).

Parmi ces PNSP, 17,18% ont eu une sensibilité diminuée (PSDP) et 15,82% une résistance franche (PRP).

Ces données n'ont pas été aussi significatives que celles obtenues lors d'une étude de surveillance de la sensibilité des pneumocoques menée à Taiwan de Nov.1998 à Mai 1999 [64].

KWENTAY Luh et Al ont découvert 76% de souches non sensibles à la Pénicilline dont 51% de PSDP et 25% de PRP [64].

De même, il a été démontré en Finlande, lors d'une étude menée de 1996 à 2000 sur 1190 pneumocoques, 58,82% de PSDP et 41,18% de PRP [81]. Une récente recherche a aussi trouvé 50,4% de PNSP [53].

Par contre les résultats obtenus dans les pays de l'Europe de l'Est sont restés légèrement inférieurs aux nôtres 30,9% de PNSP avec 14,3% de PSDP et 16,6% de PRP [4].

Ces résultats confirment une fois de plus l'évolution des pneumocoques résistants à la Pénicilline dans notre pays, et un peu partout dans le monde. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine : l'accessibilité des médicaments surtout les génériques qui ne coûtent pas en général chers, le recours à une antibiothérapie dès l'apparition d'une fièvre et le plus important de tous, la sélection de mutants souvent due à un arrêt de traitement suite à l'amélioration de l'état du malade.

Tous les PSDP et PSP ont été sensibles à l'action des autres bêta-lactamines testés.

14,89% des PRP ont été résistantes à l'amoxicilline, 17,02% à l'association amoxicilline / acide clavulanique, 57,45% à la Cefotaxime et 4,26% à la Ceftriaxone. La résistance à l'amoxicilline est rarement retrouvée car elle est reconnue avec une excellente activité in vitro chez les pneumocoques et la sélection de mutant par cet antibiotique est moins fréquente [53].

#### ***IV.1.1.2. Phénotypes de résistances***

Les seuls phénotypes retrouvés avec les Bêta-lactamines ont été pénicilline G observé sur 51 souches et pénicilline G sur 47 souches dont la plupart ont eu des résistances croisées avec les autres Bêta-lactamines.

### ***IV.1.1.3. Déterminisme génétique [76] [59] [72]***

L'action antibactérienne majeure de la pénicilline tient de son aptitude à se lier et à inactiver les protéines liant la pénicilline qui sont les principales cibles.

La résistance à la Pénicilline chez les pneumocoques est due à une altération de ces PLPS [53].

Six PLPS ont été identifiées, parmi lesquelles 5 de haut poids moléculaire (1a, 1b, 2a, 2b et 2x) et une de bas poids moléculaire PLP 3 [48].

Il a été démontré que dans tous les PLPs, les centres catalytiques de la transpeptidase étaient définis par 3 motifs d'acides aminés conservés : SXXK (incluant le site actif de la serine), SXN et KT (S) G. Ceci a été démontré avec la souche SpnR6 [45].

En effet, l'affinité diminuée des PLP1a, 2x et 2b des  $\beta$ -lactamines joue un rôle important dans cette résistance.

Toutefois, les expériences de laboratoire ont prouvé qu'une diminution de l'affinité des PLPs, 2b et 2X conférait un bas niveau de résistance et qu'elle est préalable pour un haut niveau de résistance [53].

Chez les PRP en plus des altérations observées sur les PLP2b et 2x, nous avons une diminution de l'affinité de la PLP1a [53].

Lors des études menées par NAGAI et Al sur les souches de *Streptococcus pneumoniae* R6, il a été démontré qu'il n'y avait aucun changement chez les PSDP, dans les motifs STMK, SRN et KTG de la PLP 1a portant respectivement les acides aminés aux positions : 370 à 373, 428 à 430 et 557 à 559. [53].

Concernant les modifications au niveau de la PLP 2x, la sensibilité intermédiaire peut être due à une substitution de la T338 en A ou P du motif STMK. De même des changements de H394 en Y et L 546 en V peuvent être vus. [53]

Pour ce qui est de la PLP 2b, les seules altérations ont été observées au niveau du motif SSNT. Le T445 a été remplacé par l'alanine (A) [53].

Cette mutation concerne tous les pneumocoques non sensibles à la pénicilline (PNSP).

Il a aussi été avancé que la substitution 574 SQF – NTG dans la PLP 1a jouait un rôle important dans le développement de la résistance [.....] mais ceci reste à prouver puisque ce changement n'a pas été trouvé dans les sites de liaison de la Pénicilline.

Chez les PRP, plusieurs changements ont été à l'origine de la résistance. D'abord au niveau de la PLP 1a, une substitution de la T371 par l'alanine ou la Serine a été observée [5, 49, 60].

La PLP 2x a été la plus touchée. Une modification de la T338 en A ou P a été constatée.

En plus de cela, s'est ajoutée une substitution du résidu M339 en F chez les souches plus résistantes.

Un remplacement de la L546 en V (valine) au niveau du motif LKSG est également impliqué.

En outre, dans la PLP 2b, un changement a été retrouvé au niveau du motif SSNT. La T445 a été remplacée par l'alanine. C'est l'unique modification qui a été détectée dans cette protéine.

Les substitutions au niveau du motif STMK de la PLP 1a et SSNT de la PLP 2b sont prédominantes dans la résistance chez les PSDP.

A celles-là s'ajoutent celles observées sur le STMK de la PLP 1a et le LKSG de la PLP 2x s'agissant des PRP.

Ces résultats sont confirmés par [KIMBERLY A., Nichol Georges G. ZHONIL and Daryl J. HOBAN] [74].

## **IV.1.2. Résistance aux macrolides**

### ***IV.1.2.1. Pourcentages de résistances***

De nos jours, on observe de plus en plus la résistance aux macrolides. Elle est plus déterminée chez les pneumocoques.

Dans notre étude, nous avons trouvé 11,9% des souches testées, résistantes à l'érythromycine (macrolide à 14 atomes de carbone).

Toutes ces résistances ont été observées chez les PRP faisant d'eux des pneumocoques multirésistants.

31,91% des PRP ont été résistants à l'érythromycine.

Les proportions de résistances ont été assez élevées dans les pays de l'Europe de l'Est de 1996 à 1997 avec 45,9% en France; 32,6 en Espagne; 31,1% en Belgique; 24,1% en Italie; 15,8% en Suisse [39].

En comparaison avec ces données, nos résultats sont moins importants mais par contre ils demeurent supérieurs à ceux obtenus en République Tchèque (4,9%), en Latvie (4,2%), en Lituanie (5,4%) et en Slovénie (4,9%) entre 1999 et 2000 [4].

Ces bas taux sont surtout dus à une faible consommation de cet antibiotique.

Dans notre pays, nous pouvons dire que c'est surtout le coût notamment élevé de ces médicaments qui est à l'origine.

Pour ce qui est de la spiramycine, toutes les résistances ont été retrouvées chez les PRP (6,38%). Elle présente une meilleure activité que l'érythromycine 2,13% des souches ont une sensibilité diminuée et 4,25% une résistance franche.

La Pristinamycine également a été inactive sur 6,38% des PRP.

La Clindamycine, seul lincosamide testé, a eu une activité diminuée chez 2 PRP ce qui correspond à 4,26%. Aucune souche n'a été totalement résistante à cette molécule, ce qui explique sa très bonne activité sur les pneumocoques.

Dans l'ensemble, la Télithromycine a eu une très bonne activité sur les pneumocoques (100% de sensibilité).

Ce taux est légèrement supérieur à celui obtenu par Peter C. APPELBAUM et Al dans leurs études en 2000 (99,8%) [4].

Ainsi, la Télithromycine peut constituer une alternative thérapeutique sur les souches résistantes aux macrolides et aux bêta-lactamines. Elle serait la nouvelle molécule sans danger pour une thérapeutique effective.

Sur cette lancée, nous rejoignons [**Fish Douglas et pharm. D**] qui avait la même approche des Kétolides dans la prise en charge des infections respiratoires [41].

#### *IV.1.2.2. Phénotypes de résistance*

Jusque là, plusieurs phénotypes de résistance ont été recensés avec les macrolides :

- le phénotype ERY (M14) qui correspond à celui de MLSB a été retrouvé chez 14 pneumocoques;

- le phénotype SPI (M16) conféré par une résistance à la spiramycine est porté par une seule souche;

- le phénotypes spi (M16 bas niveau) ou encore sensibilité diminuée à la spiramycine est porté par 1 pneumocoque. Il est aussi appelé phénotype M;

- la sensibilité intermédiaire à la Clindamycine ou Phénotype 1 est retrouvée chez une souche.

Concernant la Pristinamycine, 2 souches ont été résistantes. Il s'agit du phénotype PRI ou S.

### *IV.1.2.3. Déterminisme génétique*

Les résultats de notre étude montrent une diversité de phénotypes de résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines chez les pneumocoques.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine.

Pour ce qui est du phénotype MLSB, le premier mécanisme élucidé à été la modification de la cible. Il est secondaire à l'acquisition du gène erm B (érythromycine ribosome méthylase). Ce gène code pour une méthylase ribosomale. Une souche de *Streptococcus pneumoniae* a été découverte en Grèce portant ce gène [61].

Bien qu'il soit généralement prédominant, le gène erm B n'est pas le seul représentant de la classe des erm chez les pneumocoques. Deux souches provenant de la Hongrie et de la Pologne ont eu à porter le gène erm A [4].

La résistance intermédiaire à l'Erythromycine n'a pas été retrouvée dans notre étude malgré sa fréquente présence chez les pneumocoques. Elle est encore appelée phénotype d'efflux, et elle est due au gène mefE qui a été par la suite remplacé par le gène mef A [86].

Ce gène a été retrouvé chez 13,9% des souches résistantes à l'Erythromycine (25) dont 12 en Bulgarie, 3 en Croatie, Lituanie et Pologne, 2 en Slovénie et enfin 1 en République Chèque et en Latvie [4].

La pompe mef A fait partie des facilitateurs majeurs, elle comprend 12 domaines transmembranaires franchissant la membrane cytoplasmique. L'efflux est provoqué par la force motrice du proton qui expulse l'antibiotique [25].

Cette pompe semble être spécifique à l'érythromycine et apparentés mais aussi à l'azythromycine. Les macrolides à 16 atomes, les lincosamides et les streptogramines n'agissant pas sur la pompe, restent actifs même après induction

par l'érythromycine, ce qui pourra jouer un rôle important dans la prise en charge des infections respiratoires.

D'autres mécanismes peuvent aussi être à l'origine de la résistance à l'érythromycine.

Il s'agit de mutations au niveau des domaines II et V de la sous-unité 23S de l'ARNr.

Ses mutations peuvent changer les propriétés de surface et perturber la structure tridimensionnelle de la sous-unité 23S de l'ARN au niveau de plusieurs sites comme proposé chez *E. coli* et donc empêcher la liaison de l'ATB [46].

Des études menées ont avancé, après amplification des fragments rrl des domaines V (2) et domaine II (1), que G 2057, A2058, A2062, G 2505, C2611 et A752 étaient les bases impliquées dans la résistance à l'érythromycine. [22] Les positions de ces bases ont été déterminées chez *Escherichia coli*.

Par ailleurs, Roland LECLERQ et Patrice COURVALIN avaient démontré que le nucléotide A2058 était la clé de la liaison de l'érythromycine. Sa modification de façon marquée réduit son affinité par rapport à l'ATB probablement en empêchant son accès direct ou en modifiant la conformation du site de liaison [22].

Les souches résistantes à l'érythromycine ayant une mutation A2059G sont moins résistantes que celles ayant une substitution A 2059C [82].

Concernant les mutations de la protéine ribosomale L22 dans la résistance à l'érythromycine, des études ont démontré qu'au niveau de la G284A un changement de la glycine en acide aspartique de la position 95 (G95D) chez le pneumocoque pouvait engendrer cette absence de sensibilité.

Mais également, une substitution à la P99Q correspondant au point de mutation C296A dans le gène rrl du domaine V conférait cette résistance.

Par ailleurs, il faut aussi noter que 15% des souches provenant de différents pays de l'Europe de l'Est, résistantes à l'érythromycine, portaient une mutation de la protéine L4.

Cette dernière consistait en une substitution de 69Gly Tyr Gly à TyrPheSer. Jusqu'ici, la mutation au niveau de C2611 n'a été détectée que chez des mutants de laboratoire [57, 93, 96].

Il est possible que la résistance de bas niveau aux macrolides conférée par cette mutation puisse expliquer pourquoi de tels mutants n'ont pas émergé pendant le traitement par les macrolides.

La sensibilité diminuée à la clindamycine ou phénotype ML (bas niveau) obtenue est due à des mutations au niveau de la sous-unité 23S de l'ARN ribosomale.

Jusqu'à présent, aucune mutation n'a été indiquée comme étant à l'origine de la résistance à la Clindamycine seule (L), sinon des études ont prouvé que les substitutions au niveau de C 2611U et C2610U avaient de faibles impacts sur les activités des macrolides et de la Clindamycine et ne permettent pas de caractériser les souches de résistantes [22]. Ceci pourrait être à l'origine de la sensibilité diminuée à la clindamycine obtenu dans notre étude.

Pour la Pristinamycine, aucune des mutations trouvées dans la sous unité 23S de l'ARN ribosomale n'était à l'origine de sa résistance, le phénotype PRI (S) est dû au phénomène d'efflux ou a une sécrétion enzymatique [22].

### **IV.1.3. Résistance croisée**

Elle est due par plusieurs antibiotiques d'une même classe.

#### ***IV.1.3.1. Pourcentages de résistance***

2,13% des pneumocoques ont eu une résistance croisée à l'AMX et l'AMC.

Ce même taux a été retrouvé pour la résistance à la Pristinamycine croisée à une sensibilité diminuée à la spiramycine.

Une résistance à l'érythromycine associée à une sensibilité intermédiaire à la clindamycine a été portée par un pneumocoque (2,13%).

6 souches ont été insensibles à l'action combinée de l'amoxicilline et de l'amoxicilline / acide clavulanique soit 12,77%. Ces pourcentages confirment une fois de plus l'existence de pneumocoques résistants au Sénégal.

#### ***IV.1.3.2. Phénotypes de résistance***

Quatre phénotypes de résistance ont été recensés :

- AMX – amc;
- AMX – AMC;
- PRI – spi (MS) ;
- ERY - cli (ML bas niveau).

#### ***IV.1.3.3. Déterminisme génétique [35]***

Les résistances croisées sont dues au même mécanisme que celui des antibiotiques de la classe concernée.

En se basant sur des études faites, on peut dire que la résistance à l'amoxicilline a comme origine, des modifications au niveau de la PLP2x.

Ces dernières contribuent à la diminution de sa sensibilité, mais ne peuvent en aucun cas jouer un rôle dans le développement du haut niveau de résistance.

Trois mutations sont concernées : changement de la Met 339 en Phe dans le site de la sérine, celui de l'ILE 336 en Met, enfin le remplacement de la Met 400 par la Thr.

L'on a découvert par la suite que ces altérations provoquaient une augmentation de la résistance à la Cefotaxime. Et depuis lors la PLP2x a été considérée comme la cible de cet antibiotique et ses altérations contribuent plus au développement de sa résistance qu'à celle de l'amoxicilline.

C'est la PLP2b qui paraît jouer un rôle primordial dans la résistance à l'amoxicilline.

Deux groupes de substitutions distincts d'acides aminés ont été observés dans les gènes de la PLP2b provenant de souches isolées en France. Le premier a lieu à l'intérieur de la triade Ser 442-Ser-Asn. Les mutations existant dans cette zone, en particulier, la substitution de l'alanine par la thréonine 445, peuvent contribuer au développement de la résistance de bas niveau à l'amoxicilline.

Le deuxième groupe est centré autour de la triade Lys 614-Thr-Gly qui est essentielle à l'acquisition du haut niveau de résistance à l'amoxicilline.

La résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est causée par les modifications des PLP1a et 2x.

COFFEY et Al ont observé deux mutations (Met 339 en Phe et Met 400 en Thr) chez deux souches ayant une résistance franche à la Cefotaxime. [27]

A l'opposé de la résistance à la Pénicilline, la PLP 2b n'intervient pas dans l'activité des CSP de 3<sup>ème</sup> génération et donc a une cible de moins [43]. Les PLPs altérées semblent bâtir une membrane cellulaire inhabituelle, chimiquement caractérisée par d'abondants muropeptides ramifiés, contrairement aux pneumocoques sensibles à la pénicilline où la plupart des muropeptides sont linéaires [44].

Cette résistance peut être inversée par inactivation des gènes impliqués dans la synthèse de cette membrane de mucopeptides ramifiés [40] qui pourraient devenir de nouvelles cibles pour les PRP.

Concernant la résistance croisée aux macrolides, il a été démontré que le gène *rplV* de la protéine L22 jouait un rôle important en conférant une résistance aux streptogramines et une sensibilité diminuée aux macrolides [61, 22]. Les altérations se situent au niveau de : G95D, P99Q, A93E, P91S et G83E.

Par ailleurs, DEPARDIEU F. et P. COURVALIN ont eu une souche de pneumocoque non obtenue jusqu'à présent *in vitro*, ayant un rare phénotype avec un haut niveau de résistance à la Spiramycine, à la streptogramine B et une résistance moyenne à la streptogramine A et B et à la Pristinamycine.

Selon eux, cette résistance serait due à une mutation A 2062C [33] et cette souche resterait sensible aux macrolides à 14 et 15 atomes, à la Télithromycine et à la Clindamycine. Ce nouveau phénotype confirme que les macrolides à 14 atomes et ceux à 15 atomes ont des sites de liaison distincts.

Le phénotype M1, serait la conséquence d'une mutation A 2059G qui confère une résistance franche aux macrolides et une sensibilité intermédiaire à la Clindamycine [22,57].

#### **IV.2 RESISTANCE DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE***

En dépit de l'utilisation répandue des vaccins anti-*haemophilus b* dans les pays développés et l'incidence diminuée des maladies invasives, *Haemophilus influenzae* reste l'espèce clé dans les affections broncho-pulmonaires, du nez, de la gorge aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant [28]. Ces maladies sont plus souvent causées par les souches non capsulées [42, 55]. Le traitement de ces affections peut être sévèrement affecté par la résistance de ces espèces aux antibiotiques qui devient un sérieux problème [5, 64, 96].

## **IV.2.1. Résistance aux Bêta-lactamines**

### ***IV.2.1.1. Pourcentages de résistance***

Parmi toutes les souches étudiées, 72,22% ont été productrices de  $\beta$ -lactamases chez les *haemophilus* non capsulés et 57,14% chez le type b (capsulé). Ces taux dépassent largement ceux obtenus dans certains pays où l'incidence des bactéries excréant la  $\beta$ -lactamase atteint 50% chez le type b et 20% à 30% chez les souches non capsulés [28].

Chez le type non capsulé, 88,89% des souches ont été résistantes à l'ampicilline. Une partie de cette résistance a été observée chez les souches non productrices de Bêta-lactamases. On les appelle les souches B-lactamases négatives ampicilline résistantes (BLNAR).

Elles représentent 16,67%. Toutes les résistances aux autres  $\beta$ -lactamines ont été retrouvées chez ces derniers.

8,33% des BLNAR ont été résistantes à l'amoxicilline / acide clavulanique, 50% à la Cefotaxime. Cette baisse d'activité est rarement retrouvée chez les espèces capsulées.

L'activité de la Cefotaxime a été nulle sur les souches BLNAR alors que pour les autres souches la sensibilité a été totale.

Cette grande sensibilité a été confirmée par des études menées en Europe de l'Ouest et aux USA où elle a été à 100% [39, 58].

Chez le type b, 14,29% des souches ont été résistantes à l'amoxicilline. L'amoxicilline / acide clavulanique et la Cefotaxime ont été actives sur l'ensemble des souches, d'où l'intérêt de faire la différence entre ces deux espèces orientant la thérapeutique à adopter.

#### ***IV.2.1.2 Phénotypes de résistance***

Le phénotype le plus fréquent chez les *Haemophilus* non capsulés a été celui de CTX observé chez 41,67% des BLNAR.

Ensuite nous avons le ctx et l'AMC chez 8,33% des BLNAR.

Enfin nous avons le phénotype AMX chez les BLNAR du type b.

#### ***IV.2.1.3. Déterminisme génétique [32, 56, 83]***

Les principaux mécanismes responsables de la résistance aux bêta-lactamines ont été : l'hydrolyse enzymatique de l'antibiotique et la modification des PLPs.

En effet la production de  $\beta$ -lactamases a été le principal mécanisme de résistance observé parmi les *Haemophilus* [28].

Le plus fréquent des  $\beta$ -lactamases est le TEM1. Elle est constitutive et de localisation périplasmique [56, 88]. On peut également retrouver le type ROB1 mais rarement.

Les mécanismes de résistance autres que la production de  $\beta$ -lactamases sont basés sur la diminution de l'affinité des PLPs impliquées dans la synthèse du peptidoglycane [24].

Il s'agit d'une résistance d'origine chromosomique retrouvée chez les souches BLNAR.

Les résultats de CIAIROUX et al [24] MALOUIN et al [66], MENDELMAN et al [67,68], BRYAN et LARR [78] ont démontré que les seuls facteurs impliqués dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines via les PLPs étaient les modifications au niveau des PLP3a et ou 3B avec le gène *ftsI*.

Il s'agit d'une substitution de Asn 526 par la lys.

Contrairement à ce qui a été découvert chez *Streptococcus pneumoniae*, le gène évoqué chez les *Haemophilus* ne présente pas une structure mosaïque.

La résistance à l'amoxicilline/acide clavulanique serait due à une mutation affectant le gène codant la  $\beta$ -lactamase TEM, qui lui confère une sensibilité diminuée aux inhibiteurs. Cette catégorie de  $\beta$ -lactamases a été dénommée TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs).

## **IV.2.2. Résistance aux macrolides**

### ***IV.2.2.1. Pourcentages***

■ La plupart des souches d'*Haemophilus* ont été résistantes aux macrolides, 50% des souches ampi R  $\beta$ -lactamases positives ont été insensibles à l'Erythromycine dont 19,23% de sensibilité diminuée et 30,77% de résistance franche. 33,33% des BLNAR ont été résistantes à l'Ery et 25% intermédiaire.

La spiramycine a été inactive sur 7,7% des souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

La Pristanamycine a eu une activité sur 33,33% des souches.

■ Chez les *Haemophilus* de type b, une résistance à la spiramycine a été retrouvée chez 33,33 % des BLNAR.

La Pristinamycine n'a été active que sur 23,1% des souches.

Ces fortes proportions expliquent pourquoi de telles molécules ne sont pas recommandées dans le traitement des infections à *Haemophilus*.

### ***IV.2.2.2. Phénotypes***

■ Chez les espèces non capsulées : MLSB, M14, retrouvés sur les souches productrices de  $\beta$ -lactamases et les BLNAR.

Le phénotype SPI (M16) retrouvé uniquement chez les *Haemophilus* BL+.

■ Chez les espèces capsulées : SPI (M16) retrouvé chez les souches BL+.

C'est la résistance à l'érythromycine qui a été le plus souvent rencontrée.

### ***IV.2.2.3. Déterminisme génétique [80,19]***

Les macrolides étant souvent utilisés dans le traitement empirique de ces affections peuvent devenir inactifs.

Cette résistance peut être due soit à une diminution de la perméabilité membranaire s'opposant à la pénétration de l'antibiotique soit à un phénomène d'efflux.

Par ailleurs, des études ont montré que les mutations au niveau de la sous-unité 23S de l'ARNr et les protéines L4 et L22 étaient responsables du haut niveau de résistance aux macrolides.

Il a été démontré que les *Haemophilus* pouvaient devenir résistantes aux macrolides par acquisition d'une altération R88P dans la protéine L22. Cette mutation consiste en une substitution de l'arginine par la proline en position 88.

Néanmoins, il faut préciser que chez les *Haemophilus*, le mécanisme de résistance le plus fréquent a été l'efflux qui code pour le gène Acr AB avec un taux supérieur à 98%.

Bulent BOZDOGAN et al ont eu à démontrer en 2004 que la mutation ribosomale ne pouvait pas à elle seule conférer une résistance en l'absence du phénomène d'efflux et que le haut niveau de résistance aux macrolides nécessitait une association des deux.

## **IV.2.3. Résistance croisée**

### ***IV.2.3.1. Pourcentages***

■ Chez les souches capsulées :

- 33,33% des BLNAR ont été résistantes à la spiramycine et à la pristinamycine

- 100% des *haemophilus* productrices de  $\beta$ -lactamase ont été résistantes à la spiramycine et à la pristinamycine.

■ Chez les souches non capsulées :

- 8,33% des BLNAR ont eu une résistance combinée à l'Amoxicilline, l'amox / clav et à la cefotaxime.

- Ce même pourcentage a été rencontré pour la résistance croisée de la spiramycine et la pristinamycine.

- 11,54% des souches productrices de  $\beta$ -lactamases ont été résistantes à la spiramycine et à la pristinamycine et 1,9% a eu une résistance à la pristinamycine combinée à une sensibilité diminuée de la spiramycine.

#### ***IV.2.3.2 Phénotypes***

■ Chez *Haemophilus influenzae* :

- AMX-AMC

- SPI-PRI (MS)

- Spi-PRI (MS bas niveau)

■ Chez *Haemophilus influenzae* type b :

- SPI-PRI (MS)

- Spi-PRI (Msbas niveau)

#### **IV.3.3 Déterminisme génétique [76,19]**

Le phénomène d'efflux confère une multirésistance aux macrolides et apparentés pouvant expliquer les phénotypes MS obtenus dans notre étude. En effet, l'efflux augmente aussi les CMI des lincosamides et des streptogramines.

### **IV.3 RESISTANCE DE *MORAXELLA CATARRHALIS***

Dans notre étude, les seules résistances observées chez les souches de *Moraxella catarrhalis* ont été celles aux  $\beta$ -lactamines (Pénicilline G).

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

#### ***IV.3.1.1 Pourcentages***

66,67% des Moraxelles ont été productrices de  $\beta$ -lactamases.

Ces résultats restent inférieurs à ceux obtenus un peu partout dans le monde : en Taiwan 95,7% des souches de *Moraxella catarrhalis* isolées ont été productrices de  $\beta$ -lactamases, 92% aux USA et 93% au Canada.[64]

En effet, 66,67% des Moraxelles ont été résistantes à la Pénicilline G limitant ainsi son utilisation dans le traitement des infections respiratoires à *Moraxella catarrhalis*.

En ce qui concerne les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, l'amoxicilline, l'amox/clav, les macrolides et apparentés, leur excellente activité a été démontrée à travers cet étude.

100% des souches ont été sensibles à ces antibiotiques.

Ceci confirme une fois de plus l'efficacité des CSP de 3<sup>ème</sup> génération dans les infections respiratoires à *Moraxella catarrhalis* [17, 77].

#### **IV.3.2. Phénotypes**

Un seul phénotype a été recensé : celui de PENI G retrouvé chez les BL+.

#### **IV.3.3. Déterminisme génétique [39, 64]**

Le mécanisme élucidé comme étant à l'origine de la résistance à la Pénicilline G a été la production de  $\beta$ -lactamases.

Plusieurs études ont eu à le confirmer notamment dans un grand nombre de centres d'études aux USA, de même que David FELMINGHAM, Reuben N. GRUNEBERG and the Alexander group et Kwenty LUH et al.

Les infections respiratoires surtout les pneumonies, en dépit des progrès de l'antibiothérapie, demeurent une affection fréquente et grave dans les pays en voie de développement et constituent un réel problème de santé.

Leur fréquence et leur gravité font d'elles, la principale cause de morbidité chez l'enfant.

Au Sénégal, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* sont les principales bactéries responsables des infections respiratoires.

Durant ces dernières années, l'utilisation des antibiotiques notamment les nouvelles molécules a été d'un grand succès.

Toutefois, l'apparition et la propagation de souches bactériennes résistantes et multirésistantes, constituent une réalité préoccupante pour le microbiologiste et le clinicien.

Cette résistance a tout d'abord commencé avec les  $\beta$ -lactamines (la pénicilline G) et s'est ensuite étendue aux macrolides.

Ce travail a été entrepris dans le but d'établir l'état actuel de la résistance des bactéries citées ci haut aux  $\beta$ -lactamines et macrolides, et de prédire les différents mécanismes qui en sont à l'origine.

Notre étude a porté au total sur 389 souches dont 297 pneumocoques, 72 *Haemophilus* non capsulés, 14 *Haemophilus* capsulés et 6 *Moraxelles*.

Les souches étudiées ont été collectées de 1994 à 2003 selon divers prélèvements à l'exception du LCR, et ceci tout au long de l'année.

La sensibilité de ces germes a été déterminée par l'antibiogramme standard et la méthode E-test.

Par la suite nous avons établi les profils de résistance et prédit les mécanismes de résistance.

Au cours de notre étude, nous avons noté une grande diversité de phénotypes de résistance.

#### ✚ Chez *Streptococcus pneumoniae* :

Les souches ont montré une grande résistance à la Pénicilline G (33%), et la présence de résistance aux autres  $\beta$ -lactamines et macrolides chez les PRP démontre une fois de plus l'existence de pneumocoques résistants et multirésistants dans notre pays.

Concernant les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, des modifications au niveau des PLPs et plus précisément des substitutions d'acides aminés à des positions différentes ont été trouvées. Ces changements ont surtout concerné les PLPs 1a, 2b et 2x.

Les macrolides ont démontré différentes manières de sélectionner la résistance.

Les mécanismes de résistance prédominants ont été :

- la méthylation ribosomale rencontrée avec le phénotype MLSB qui code pour le gène ermB(AM).

- Le phénomène d'efflux ou mef A

Des séries de mutations au niveau de la sous unité 23S de l' ARNr, de la protéine L4 et L22 peuvent aussi induire une résistance.

L'apparition de ces mécanismes de résistance est particulièrement fascinante.

#### ✚ Chez *Haemophilus influenzae* :

La plupart des résistances a été retrouvée chez les souches BLNAR aussi bien pour les souches capsulées que pour celles dépourvues de capsules.

Les fortes proportions de résistances aux macrolides : 73,3% pour l'érythromycine chez *Haemophilus influenzae* et 78,57% pour la spiramycine

chez *Haemophilus influenzae* type b expliquent pourquoi de telles molécules sont exclues dans le traitement des infections respiratoires dues à ces germes.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines a été le plus souvent causée par le gène TEM1 chez les souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

Chez les BLNAR, cette résistance a été la conséquence de mutations des PLPs 3a et ou 3b avec comme gène le *ftsI*.

La résistance de haut niveau aux macrolides associe elle, deux mécanismes l'efflux avec le gène Acr AB et la mutation ribosomale.

#### Chez *Moraxella catarrhalis* :

Les seules résistances obtenues ont eu lieu avec la Pénicilline G(66,67%) retrouvées chez les souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

Le mécanisme élucidé jusque là comme en étant l'origine a été la production de  $\beta$ -lactamases.

Ainsi pour pallier ces résistances, le choix pourrait porter sur la télithromycine dans les infections pneumococciques, et l'association amox/clav dans les infections causées par *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*.

Cependant, il s'avère nécessaire de tenir compte de certaines mesures de base pour limiter l'émergence et la diffusion de souches multirésistantes et de préserver les molécules les plus actives :

- l'association d'antibiotiques car la prescription exclusive ou quasi exclusive d'un seul type d'antibiotique représente une pression de sélection forte qu'il faut prendre en considération;

- éviter la consommation déraisonnée et abusive des antibiotiques par une éducation sanitaire des populations, et surtout le respect des règles de délivrance de ces médicaments;

■ encourager aussi une bonne coordination entre clinicien et microbiologiste qui est indispensable pour une bonne prise en charge thérapeutique.

De nouveaux médicaments sont en perspective; il s'agit de l'ACTINONINE VRC 4232 et VRC4307 qui sont des inhibiteurs de la déformylase. Ils sont bactéricides sur *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* et pourraient constituer une alternative en as de multirésistance.

- [1] **ALBERT B., WILLIAM J.H., KENNETH L.H., HENRY D.I., SHADOMY HJ**  
Manual of clinical microbiology  
ASM, 5<sup>th</sup> edition, 1991 : 243-244
- [2] **ALOUF J.E.**  
Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin).  
*Pharmacol. Therap.*, 1980; **11** : 661-717.
- [3] **APPELBAUM P.C.**  
Epidemiology and in vitro susceptibility of drug-résistant *Streptococcus pneumoniae*.  
*Pédiatr. Infect. Dis. J.*, 1996 ; **15** : 932-939.
- [4] **APPELBAUM P.C. et al.**  
Susceptibilities to telithromycin and six others agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 pneumococci from 10 central and eastern European countries.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, feb 2002; **46** : 371-377.
- [5] **ASAHI Y., TAKEUCHI Y. and UBUKATA**  
Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; **43** : 1252-1255.
- [6] **BAMBEKE F.V, VERHAEGEN J., TYTECA D., AUCKENTHALER R., TULKENS P.M.**  
Erythromycine et néomacrolides actuels, usages cliniques et perspectives.  
*Louvain Med* 2000 ; **119** : 259- 286.
- [7] **BERCHE P.**  
*Haemophilus influenzae* et espèces bactériennes apparentées.  
*In le MINOR L. ; VERON M.*  
*Bactériologie Médicale, PARIS, Flammarion Med. Sciences*, 1982 : 342-353.

**[8] BERRY A. M., LOCK R. A., HANSMAN D., PATON J. C.**

Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*.  
*Infect. Immun.*, 1989, **57** : 2324-2330.

**[9] BERRY A.M., YOTHER J., BRILES D.E. et al.**

Reduced virulence of a defined pneumolysin. Negative mutant of  
*Streptococcus pneumoniae*.  
*Infect.Immun.*, 1989; **57** : 2037-42.

**[10] BINGEN E.**

Classification structurale des bêta-lactamines et relation structure activité.  
In " Mécanismes d'action des bêta-lactamines : de la structure bactérienne  
à la structure de la molécule "  
*Roussel*, Nice, 1986 : 47 - 62.

**[11] BINGEN E.**

Mécanismes d'action des bêta-lactamines. In " Mécanismes d'action des  
bêta-lactamines : de la structure bactérienne à la structure de la molécule "  
*Roussel*, Nice, 1986 : 7-30..

**[12] BINGEN E., LAMBERT-ZECHVOSKY N., DROUX M. C.,  
BRIGEN-BIDOIS M.**

Détermination des biotypes du genre *Haemophilus* et étude de la sensibilité à  
l'ampicilline en pratique hospitalière. Etude de 500 souches.  
*Ann. Biol. Clin.*, 1982 ; **40** : 597-662.

**[13] BIRGERT T., LARD B., EVA D., JULIAN L., RAGNAR N.**

Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* strains by coagglutination and  
counter immunoelectrophoresis.  
*J. Clin. Microbiol.*, 1983 : 978-980.

**[14] BOULIVOIS G.J.**

Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by  
*Streptococcus pneumoniae*.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1992; **138** : 249-59.

- [15] **BOURGEOIS F., LAMBERT-ZECHOVSKY N., BINGEN E.**  
Aspects cliniques, diagnostics et thérapeutiques des infections : *Moraxella catarrhalis*  
*Patho. Biol.*, 1993; **41** (6) : 555-561.
- [16] **BRADLEY J. S., CONNOR J. D.**  
Ceftriaxone failure in meningitidis caused by *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to beta-lactam antibiotic.  
*Pediat. Infect. Dis.*, 1991; **10** : 871-873.
- [17] **BROUSSIN B., CARRIERE J. P.**  
Infections broncho- pulmonaires et ORL de l'enfant.  
Etude clinique de l'efficacité et de la tolérance du Céfixime (OROKEN).  
*Revue Internationale du Pédiatre*, Sept. 1991; **213** : 3-7.
- [18] **BRUEGGEMANN A. B., DOERN G.V, HUYNH H.K, WINGERT E.M, RHOMBERG P. R.**  
*In vitro* activity of ABT-773, a new ketolide, against recent clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.  
*Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2000; **44** (2) : 447-449.
- [19] **BÜLENT B., PERIC M., GALDERISI C., KRISSINGER D., RAGER T. and APPELBAUM P.C.**  
Inability of L22 ribosomal protein alteration to increase macrolide MICs in the absence of efflux mechanism in *Haemophilus influenzae* HMC-S.  
*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; **54** : 393-400.
- [20]-**BURNICHON N., TEXIER A.**  
L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques  
*DES Bactériologie, Semestre été 2003*, Exposé du 20 Juin 2003
- [21] **BUSSARD A.**  
Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : l'électrosynérèse.  
*Biochem. Biophys. Actual.*, 1959; **34** : 258-263.

- [22] **CANU A., MALBURNY B., COQUEMONT M., DAVIES A.T., APPELBAUM P.C and LECLERCQ R.**

Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to Macrolides, Clindamycin, Streptogramin and Telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan 2002; **46** : 125-131.

- [23] **CENTER of DISEASE CONTROL.**

Follow-up on multiple antibiotic-resistant pneumococci, South Africa.

*Morbid. Mortal. Week Rep.*, 1978; **27** : 1-2.

- [24] **CLAIROUX N., PICARD M., BROCHU.A, ROUSSEAU.N, GOURDE.P, BEAUCHAMP.D, PARR.T.R, BERGERON.G.M and MALOUIN.F.**

Molecular basis of the non-bêta-lactamase-mediated resistance to beta-lam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada.

*Atimicrob. Agents Chemother.*, 1992; **36** : 1504-1513.

- [25] **CLANCY J., PETITPAS J., DIB-HAJJ F., YUAN W., CRONAN M., KAMATH A.V., BERGERON J. and RETSEMA J.A.**

Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefa, from *Streptococcus pyogenes*.

*Mol. Microbiol.*, 1996; **22** : 867-879.

- [26] **CLEGBAZA .S.**

*Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae et Moraxella catarrhalis* dans les infections respiratoires basses communautaires à Dakar : Isolement bactérien et sensibilité aux antibiotiques.

*Thèse Pharm., Dakar*, 2000, n°81.

- [27] **COFFEY T. J., DANIELS M., Mc DOUGAL, DOWSON C.G., TENOVER F.C. and SPRATT B.G.**

Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high level resistance to expanded-spectrum cephalosporins.

*Antimicrob. Agents Chemother.*, **39** : 1306-1313.

- [28] **DABERNAT.H., DELMAS C., SEGUY M., PELISSIER R., FAUCON G., BENNAMANI S. and PASQUIER C.**  
Diversity of  $\beta$ -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein3 of *Haemophilus influenzae*.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jul 2002; **46** : 2202-2218.
- [29] **DABERNAT H., SANSON-LEPORS M. J.**  
*Haemophilus* in Le Minor L., Veron M., Bact.Med.  
*Med. Science Flammarion*, Paris, 1990, 2ème édit. : 521-544.
- [30] **DABERNAT H., SEGHY M., DELMAS C., LARENG C.**  
Situation en 1993 de la résistance aux antibiotiques chez *Haemophilus influenzae* en France (Bilan du PC)  
Centre de référence pour *Haemophilus influenzae*  
*Med. Mal. Infect.*, 1994; **24** : 1244-1247.
- [31] **DAVIES T.A., DEWASSE B.E., JACOBS M.R., APPELBAUM P.C.**  
In vitro development of resistance to Telithromycin (HMR 3647), four macrolides, clindamycin and pristinamycin in *Streptococcus pneumoniae*.  
*Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2000; **44** (2) : 414-417.
- [32] **DE GROOT, DZOLJIC-DANILOVIC R. G., VAN KLINGEREN B, GOESSENS W.H.F. and NEYENS H.J.**  
Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* mechanisms, clinical importance and consequences for therapy.  
*Eur. J. Pediatr.*, 1991; **150** : 534-546.
- [33] **DEPARDIEU F. and COURVALIN P.**  
Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; **45** : 319-323.
- [34] **DOUTHWAITE S., CHAMPEY W.S.**  
Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site.  
*J. Antimicrob. Chemother.*, 2001; **48** Suppl T1: 1-8.

**[35] DU PLESSIS M., BIGEN E. and KLUGMAN K.P.**

Analysys of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug.2002; **46** : 2349-2357.

**[36] DUVAL J.**

Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens.

In : Le Minor L, Veron M, eds.

*Bactériologie Médicale, Flammarion*, Paris, 1989 ; 2<sup>ème</sup> édit. : 273-96.

**[37] FELDMAN C., MUNRO N.C., JEFFREY R.K. et al.**

Pneumolysin induces the salient histological features of pneumococcal infection in the rat lung *in vivo*.

*Am. J. Resp.Cell. Molecul. Biol.*, 1991; **5** : 416-423.

**[38] FENOL A., JADO I., VICIOSO D., PEREZ A. and CASAL J.**

Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990-1996).

*J. Clin. Microbiol.*, **36** : 3447-3454.

**[39] FELMINGHAM D., GRÜENBURG R.N and the Alexander Project Group.**

The Alexander project 1996-1997:Last susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections.

*Antimicrob. Agents and Chemother.*, 2000; **45** : 191-203.

**[40] FILIPE S.R, TOMASZ A.**

Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes.

*Proc. Natl Acad Sci.*, USA, 2000 : 4891-96.

**[41] FISH D., PHARM D.**

Trends in the management of respiratory tract infections.

*Mol. Microbiol.*, 1998; **42** : 965-966.

**[42] FOXWELL A.R., KYD J.M. and CRIPPS A.W.**

Nontypable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention.  
*Microbiol. Mol. Rev.*, **62** : 294-308.

**[43] GARAU J.**

Treatment of drug-resistance pneumococcal pneumoniae.  
*Infectious diseases.*, Jul 2002; **2** : 404-415.

**[44] GARCIA B.J., TOMASZ A.**

Biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistance pneumococci.  
*Proc. Natl Acad Sci, USA*, 1990; **87** : 5415-19.

**[45] GHUYSEN, C.G., HUTCHISON.A and SPRATT, B.G.**

Nucleotide sequence of the penicillin binding protein 2B Gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R6.  
*Nucleic Acids Res.*, **17** : 7518.

**[46] GREGORY S.T and DOHLBERG A.E.**

Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23S ribosomal RNA.  
*Mol. Biol.*, 1999; **289** : 827-834.

**[47] GUNNISON J.B., FRABER M.A., PELCHER E.A. et al.**

Penicillin-resistant variants of pneumococci.  
*Appl. Microbiol.*, 1968; **16** : 311-314.

**[48] HAKENBECK R., ELLERBROCK H., BRIESE T., HANAWEERGER S. and TOMASZ A.**

Penicillin binding proteins of penicillin- susceptible and resistance pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the  $\beta$ -lactam binding site .  
*Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1996; **30** : 553-558.

- [49] **HAKENBECK R., KÖNIG A., KERN I., VAN DER LINDEN M., KECK W., BILLOT-KLEIN D., LEGRAND R., SCHOOT B. and GUTMANN L.**

Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high level  $\beta$ -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*.

*J. Bacteriol.*, 1998; **180** : 673-678.

- [50] **HOBAN D.J, WIERZBOWSKI A.K., NICHOL K., ZHANEL G.G.**

Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998-1999: Prevalence of *mef(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides.

*Antimicrob Agents Chemother.*, 2001; **45** : 2147-2150.

- [51] **HOUPKOUNOU E.**

Etude comparée de l'identification et de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* isolées d'infections humaines.

(Données prospectives à Dakar)

*Thèse Pharm.*, Dakar, 2003, n° 43.

- [52] **HSUEH P.R., TENG L.J., LEE L.N, YANG P.C, HO S.W & LUH K.T.**

Extremely high incidence of macrolide and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan.

*Clin. Microbiol.*, 1999; **37** : 897-901.

- [53] **JACOBS M.R., BAJAKSOUZIAN S., ZILLES A., LIN G. et al.**

Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters : 1997 U.S Surveillance study.

*Antimicrob. Agents and Chemotherapy.* 1999; **43** : 1901-1908.

- [54] **JARLIER V.**

Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines.

Description et fréquence, place d'E. cloacae.

*Med. Mal. Infect* ; 1988, hors serie : 30-40.

**[55] JORDENS J.Z. and SLERCK M.P.E.**

*Haemophilus influenzae*: then and now.

*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1995; **14** : 935-948.

**[56] JORGENSEN J.H.**

Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in

*Haemophilus influenzae*.

*Clin. Infect. Dis.* 1992 ; **14** : 1119-1123.

**[57] KAMRAD T.T., DAVIES A.T., CRONAN M., JACOBS M.R., APPELBAUM P.C. and SUTCLIFFE.**

Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage .

*Antimicrob. Agents and Chemother.* 2000; **44** : 2118-2125.

**[58] KILIAN M.**

A taxonomic study of *Haemophilus influenzae* with the proposal of a new species.

*J.Gen. Microbiol.*, 1976; **3** : 9-62.

**[59] KLUGMAN K.P. and SMITH A.M.**

Alterations in penicillin-binding protein 2b from penicillin wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr. 1995; **39** : 859-867.

**[60] KLUGMAN K.P and SMITH A.M.**

Alterations in PBP1a essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998; **42** : 1329-1333.

**[61] LECLERC.R. and COURVALIN P.**

Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sept 2002; **46** : 2727-2734.

**[62] LEMONIER M.**

Notes de pharmacology: Antibiotiques et Antibiorésistance  
*Pharmacology* 1999 ; **5** : 225-233

**[63] LIU M., DOUTHWAITE S.**

Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA.  
*Antimicrob. Agents. Chemother.* 2002; **46** (6):1629-33.

**[64] LUH K.T. et al.**

Multicenter surveillance of Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998-1999 respiratory season.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. mai 2000; **44** : 1342-1345.

**[65] MAINARDI J.L. ; GOLDSTEIN F.W. ; CUTMANN L.**

Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.  
*Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses*, 8-006 N-10, 996 : 8p.

**[66] MALOIUN.F, SCHRYVERS .A.B and BRYAND L.E.**

Cloning and expression of genes responsible for altered penicillin-binding proteins 3a and 3b in *Haemophilus influenzae*.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987; **31** : 286-291.

**[67] MENDELMAN P.M., CHAFFIN D.O. and KALAITZOGLOU G.**

Penicillin-binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990 ; **25** : 525-534.

**[68] MENDELMAN P. M., CHAFFIN D.O., STRILL T. L., RUBENS C.E., MACK K. D. and SMITH A.L.**

Characterization of non- $\beta$ -lactamase mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984; **26** : 235-244.

**[69] Mc GEE L., Mc DOUGAL L., ZHOU J. et al.**

Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network.

*J. Clin. Microbiol.* 2001; **39** (7) : 2565-2571.

**[70] MOITTIE D.**

Les phénotypes de résistance des bactéries aux antibiotiques.

Option Biologie.

**[71] MUNOZ R., DOWSON C.G., DANIELS M. et al.**

Genetics of resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.

*Mol. Microbiol.* 1992; **6** : 2461-2465.

**[72] NAGAI K., DAVIES T.A., DEWASSE B.E., PANKUCH G.A., JACOBS M.R. and APPELBAUM P.C.**

In vitro developpement of resistance to ceftriaxone, cefprozil and azithromycin in *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000; **46**: 909-915.

**[73] NAGAI K., DAVIES T.A., EDNIE L.M. et al.**

Activities of a new fluoroketolide, HMR-3787, and its (des)-fluor derivative RU-64399 compared to those of telithromycin, erythromycin A, azithromycin, clarithromycin and clindamycin against macrolide-susceptible or macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*.

*Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2001; **45** (11) : 3242-3245.

**[74] NAGAI K., DAVIES T.A, JACOBS M.R. and APPELBAUM P.C.**

Effects of amino acid alterations in penicillin- binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible,-intermediate, and –resistant pneumococci.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mai 2002 ; **46**: 1273-1280.

**[75] NASSIF X.**

Facteurs de virulence de *Haemophilus influenzae*

Responsable d'otites aiguës de l'enfant.

*Lettre Infect.*, 1994 ; suppl. **18** : 26-29.

**[76] NICHOL K.A., ZHANEL G.G. and HOBAN D.J.**

Penicillin-binding protein 1a, 2b and 2x alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct 2002; **46**:3261-3264.

**[77] OFFREDO C., GEHANNO P. et BERCHE P.**

Epidémiologie de la flore pharyngée au cours des otites moyennes aiguës de l'enfant de décembre 2000 à mars 2001.

*Med. et Maladies Infectieuses*, 2003 ; **33** (2) : 93-103.

**[78] PARR T.R, J.R. and BRYAND L.E.**

Mechanism of resistance of an ampicillin-resistance,  $\beta$ -lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to  $\beta$ -lactam antibiotics.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984; **25** : 747-753.

**[79] PECHERE J.C.**

Les spécificités de l'action antibactérienne des 7-méthoxy imino céphèmes zwitterioniques (céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération).

*Path. biol.*, 1996 ; **2** : 99-105

**[80] PERIC.M, BÜLENT.B, JACOBS M.R and APPELBAUM P.C.**

Effect of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mars 2003; **47** : 1017-1022.

**[81] PIHLAJAMÄKI M., KAIJALAINEN T., HUOVINEN P., JAVALA J. and the Finnish study group for antimicrobial resistance.**

Rapid increase in macrolide resistance among penicillin non-susceptible pneumococci in Finland, 1996-2000.

*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002; **49** : 785-792.

- [82] **PIHLAJAMÄKI M., KATAJA J., SEPPÄLÄ H, ELLIOT J., LEINONEN M., HUOVINEN P. and JAVALA J.**  
Ribosomal mutations in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mars 2002; **46** : 654-658.
- [83] **POWELL M.**  
Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*.  
*Journal Med. Microbiol.*, 1988; **27** : 81-87.
- [84] **RAHMAN M.**  
Characterization of surface components of *Moraxella catarrhalis* and pathogenic *Neisseria*.  
*Karolinska Institutes, Avhandlings-databas*, 1997.
- [85] **RIOU J. Y., GUIBOURDENCHE M.**  
*Moraxella catarrhalis* : New methods of bacterial diagnostics.  
*Drugs*, 1986 : **31**(suppl. 3) : 1-6
- [86] **ROBERTS M.C., SUTCLIFFE J., COURVALIN P., JENSEN L.B, ROOD J. and SEPPALA H.**  
Nomenclature for macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B resistance determinants.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; **43** : 2823-2830.
- [87] **SAGNA I.**  
Macrolides et apparentés : étude prospective sur la sensibilité des bactéries Gram positif.  
*Thèse Pharm.*, Dakar, 2004.
- [88] **SCRIVER S.R, WALMSLEY S.L, KAU C.L, HOBAN D.J., BRUNTON J., MAGEER A., MOORE T.C., WITWICKI E., the Canadian Haemophilus study group and LOW D. E.**  
Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their  $\beta$ -lactamases.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994; **38** : 1678-1680.

**[89] SONG J.H, YANG J.W., PECK K.R., KIM S., LEE N.Y., JACOBS M.R, APPELBAUM P.C. and PAI C.H.**

Spread of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in south Korea .  
*Clin. Infect. Dis.*, 1997 ; **25** : 747-748.

**[90] SOW A. S.**

Métabolisme bactérien dans l'isolement et l'identification de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et de *Moraxella catarrhalis*.  
*Thèse Pharm .*, Dakar, 2005. n°53

**[91] THABAUT A., MEYRAN M.**

Nouvelles bêta-lactamines : Essai de classification, relation structure - activité.  
*Tempo. Méd.*, 1981, **78** : 9 -53.

**[92] VAN ALPHEN I., REMIENS T., POOLMAN J. ; ZAN E.**

Characteristics of major membrane proteine of *Haemophilus influenzae* :  
Pathogenie and epidemiological implications.  
*Jour. Bactériol.* 1983 ; **155** : 878-885

**[93] VANNUFFEL P., DI GIAMBATTISTA M., MORGAN E. A. and COCITO C.**

Identification of the single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance .  
*J.Biol. Chem.* 1992; **267**: 8377-8382.

**[94] VARON E, GUTMAN L.**

Bases moléculaires de la résistance du pneumocoque aux bêta-lactamines.  
*Méd. Mal. Infect.* 1994; **24** spécial:922-6.

**[95] VARON E, GUTMAN L.**

Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des pneumocoques.  
*Médecine Hygiène numéro revue 2475 , numéro article 23719 .*

**[96] VESTER B. and DOUTHWAITE S.**

Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA.  
*Antimicrob.Agents Chemother.* 2001; **45**: 1-12.

[97] **ZHANEL G.G, WALTERS. M, NOREDDIN. A et al.**

The ketolides : a critical review.

*Drugs*, 2002; **62**(12):1771-1804.

