

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة

المكتبة
رقم الجرد : 1968



Université de Jijel

Faculté des Science la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie appliquée et
science alimentaire

جامعة جيجل

كلية العلوم الطبيعية و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplômes d'études supérieures (DES)

Option : « Microbiologie »

Les méthodes utilisées pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

Membre de jury :

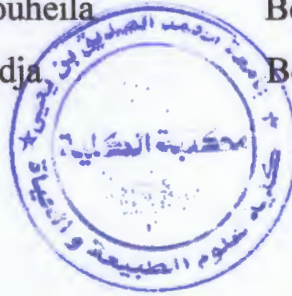
Examinatrice : Dr. Laggoune Souheila

Promotrice : M^{me}. Yousfi Khadidja

Réalisé par :

Boussebt Houda

Bousba Hala



Promotion : 2013



Dédicaces

Après un long trajet, enfin je suis en train de présenter ce Modeste travail comme Un projet de fin d'étude et tout cela

Grace à :

«Allah» qui m'indique le chemin de succès

A ma très chère Mère «Hamiani Hassina», le symbole de ça volanté que je l'aime très forte.

A mon Père «Nouredinne» qui consacre ses efforts et ses conseils pour moi, et qui m'a toujours Vers l'optimisteur.

A ma grand-mère : Yamina

A mes oncles : Omar, Messaoud, Nabile, Naaman,

Ames tantes : Saida, Kheira, Fatiha, Yasmina, Sedjia, Faiza, et Naima et Fariza.

A mes chère frères qui mon soutenu toujours : Oussama, Aissa, Rafik et Mekhtar sans Oublie le petit Mouhamed

A ma très chère amie et Sœur Amira

A toutes mes chère amies : Faiza et Wahiba, Selma, Souhaila, Yasmina, Ferial, Salima, Wissam et saleh.

A ma très chère binôme Hala et sa famille.

Houda

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles

A mes très chers parents, qui m'ont guidé et soutenu durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère et mon père merci beaucoup et que dieu vous protège nchallah.

A mon cher frère : Messaude.

A ma chère Sœur : Asma .

A mes amies : Afafe , Asmaà toutes mes amies

Mes cousines et A toute ma famille.....

A notre encadreur YOUSFI Khadidja .

Hala

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Généralité sur les entérobactéries

I.1.	Définition.....	02
I.2.	Classification	02
I.2.1.	Classification de Bergey (Bergey, 1994).....	02
I.2.2.	Classification phylogénique	02
I.2.3.	Les différentes tribus des <i>Enterobacteriaceae</i>	03
I.2.3.1.	Tribu <i>Salmonellae</i> : <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Edwardsiella</i>	03
I.2.3.2.	Tribu <i>Escherichiae</i> : <i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i>	03
I.2.3.3.	Tribu <i>Klebsielleae</i> : <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Serratia</i>	04
I.2.3.4.	Tribu <i>Proteae</i> : <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i>	04
I.2.3.5.	Tribu <i>Yersinia</i>	05
I.2.3.6.	Tribu <i>Erwiniae</i>	05
I.3.	Caractères cultureux.....	05
I.3.1.	Milieux de culture usuels pour les entérobactéries	06
I.3.1.1.	Milieux d'enrichissement sélectifs liquides.....	06
I.3.1.2.	Milieux d'isollements sélectifs.....	06
I.3.1.3.	Milieux de culture pour <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i>	07
I.3.1.4.	Autre milieux de culture.....	08
I.4.	Caractères biochimiques.....	10
I.5.	Caractères antigéniques.....	12
I.6.	Habitat et pouvoir pathogène.....	14
I.6.1.	Genre <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i>).....	14
I.6.2.	Genre <i>Shigella</i>	15
I.6.3.	Genre <i>Salmonella</i>	15
I.6.4.	Genre <i>Citrobacter</i>	16
I.6.5.	Genre <i>Edwardsiella</i>	16
I.6.6.	Genre <i>Klebsiella</i>	16
I.6.7.	Genre <i>Enterobacter</i>	17
I.6.8.	Genre <i>Serratia</i>	17
I.6.9.	Genres <i>Proteus</i> et <i>Providencia</i>	17
I.6.10.	Genre <i>Yersinia</i>	17
I.6.11.	Genre <i>Erwinia</i>	18

Chapitre II : La résistance des entérobactéries aux antibiotiques

II.1.	Définition des antibiotiques.....	19
II.2.	Classification des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	19
II.2.1.	Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane.....	19
II.2.1.1	β-lactamines.....	20
II.2.1.2	Fosfomycine.....	26
II.2.2.	Antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	26
II.2.2.1	Antibiotiques de fixant sur la sous-unité 30S du ribosome.....	26
II.2.2.2	Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome.....	27
II.2.3.	Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.....	27
II.2.4.	Antibiotiques agissant sur les membranes.....	29
II.3.	Spectre d'activité et mode d'action des antibiotiques.....	30
II.3.1.	Spectre d'action des antibiotiques	29
II.3.2.	Le mode d'action des antibiotiques.....	30
II.3.2.1	Le mode d'action des β-lactamines.....	31
II.3.2.2	Mode d'action des fosfomycines sur les bactéries.....	31
II.3.2.3	Mode d'action des aminosides.....	31
II.3.2.4	Mode d'action des tétracyclines.....	31
II.3.2.5	Mode d'action du chloramphénicol.....	31
II.3.2.6	Mode d'action de la rifampicine.....	32
II.3.2.7	Mode d'action des sulfamides et des triméthoprimes.....	32
II.3.2.8	Mode d'action des quinolones.....	32
II.3.2.9	Mode d'action des polymyxines.....	32
II.4.	La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.....	32
II.4.1.	Origines des résistances.....	33
II.4.2.	La multi-résistance.....	33
II.4.3.	Mécanismes biochimiques de résistance.....	34
II.4.3.1	L'inactivation de l'antibiotique par modifications enzymatique.....	34
II.4.3.2	Modification de la cible.....	34
II.4.3.3	Phénomènes d'imperméabilité.....	34
II.4.3.4	Phénomène d'efflux.....	35
II.5.	Mécanismes de résistance des différents antibiotiques chez les entérobactéries.....	36
II.5.1.	La résistance bactérienne aux β-lactamine.....	36
II.5.2.	La résistance bactérienne aux fosfomycines.....	36
II.5.3.	Résistance bactérienne aux aminosides.....	36
II.5.3.1	Défaut de pénétration de l'antibiotique.....	36
II.5.3.2	Modification de la cible ribosomale.....	37
II.5.3.3	Inactivation de l'antibiotique.....	37
II.5.4.	La résistance bactérienne aux tétracyclines.....	37
II.5.5.	La résistance bactérienne aux chloramphénicols.....	37
II.5.6.	Mécanisme de résistance la rifampicine des bactéries.....	37
II.5.7.	Résistance bactérienne aux sulfamides et triméthoprimes.....	38
II.5.8.	Résistance bactérienne aux quinolones.....	38
II.5.9.	Résistance bactérienne des polymyxines.....	38

Chapitre III : les méthodes utilisées pour l'étude de la résistance aux antibiotiques


III.1.	Méthodes microbiologiques.....	39
III.1.1.	Antibiogramme.....	39
III.1.1.1.	Définition de l'antibiogramme.....	39
III.1.1.2.	Les comités d'antibiogramme.....	39
III.1.2.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	40
III.1.2.1.	Méthode de diffusion en milieu solide.....	40
III.1.2.2.	Méthodes de dilution.....	41
III.1.2.3.	Antibiogramme automatique.....	43
III.1.3.	Teste complémentaire utilisés pour l'étude de la résistance aux antibiotiques.....	44
III.1.3.1.	test synergie pour la détection des BLSE.....	43
III.1.3.2.	Test de Hodge pour détecter les KPC et les métallo-carbapénèmases.....	45
III.2.	Méthodes de biologie moléculaire.....	46
III.2.1.	Technique de la PCR.....	47
III.2.2.	Exemple d'une PCR en temps réel pour la détection de gènes de carbapénèmases de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
III.3.	Méthodes biochimiques.....	48
III.3.1.	Carba NP test et BLSE NDP test.....	48
III.3.2.	Spectrométrie de masse.....	49
	Conclusion.....	52
	Bibliographie.....	53

AAC	Acétyltransférases.
ADH	Adénine Déshydrogénase.
ADN	Adénosine Désoxyribonucléique.
AMAC	Aminosides-Aminocyclitols.
ANT	Nucléotidyl-Transférases.
APH	Phosphotransférases.
ARN	Adénosine Ribonucléique.
ARNt	Adénosine Ribonucléique de Transfert.
BS	Gélose au Sulfate de Bismuth.
C1G	Céphalosporine de 1 ^{ère} Génération.
C2G	Céphalosporine de 2 ^{ème} Génération.
C3G	Céphalosporine de 3 ^{ème} Génération.
C6	Carbone 6.
CA-SFM	Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
C.A.T	Chloramphénicol Acétyl-Transférase.
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
DHFR	Dihydrofolate Réductase.
DHPS	Dihydroptéroate Synthétase.
ECA	Enterobacterial Common Antigen.
E.H.E.C	<i>E. coli</i> Entérohémorragiques.
E.I.E.C	<i>E. coli</i> Entéro-invasives.
E.P.E.C	<i>E. coli</i> Entéropathogènes.
E.T.E.C	<i>E. coli</i> Entérotoxigènes.
Elisa	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
EMB	Gélose Eosine Bleu de Méthylène.
EP	Espace Périplasmique.
ESCMID	Société Européenne de Microbiologie Clinique et Maladies Infectieuses.
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
K.E.S	<i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> .
LDC	Lysine Décarboxylase.
LDH	Lysine Déshydrogénase.
LPS	Lipopolysaccharide.
MBL	Métallo- β -Lactamase.
ME	Membrane Externe.
MHT	Modified Hodge Test.
MKTTn	Muller-Kaufmann Tetrathionate Novobiocine.
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards.
ODC	Ornithine Décarboxylase.
ONPG	Orthonitrophényl- β -Galactoside.
PAB	L'acide Para-Amino-Benzoïque.
PBPs	Protéines fixatrices de Pénicilline.
PCR	Polymerization in Chain Reaction.
PDA	Phénylalanine Désaminase.
PG	Peptidoglycane.
PLP	Protéines de Liaison des Pénicillines.
Qnr	Quinolone Resistance.

<i>forme R</i>	Rough.
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism.
<i>forme S</i>	Smooth.
SS	Gélose <i>Salmonella Shigella</i>.
TDA	Tryptophane Désaminase.
Vi	Virulence.
VP	Voges-Proskauer.
VRBG	Gélose Glucosée Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre.
XLD	Xylose, Lysine, Desoxycholate.

Figures		Pages
Figure 1	Cycle commun β -lactame (B)	20
Figure 2	Structure chimique des β -lactamines : pénames, céphèmes, monobactames et pénèmes.....	20
Figure 3	Structure des pénames	21
Figure 4	Structure des β -lactamines : pénicillines G, V et M	22
Figure 5	Structure de l'Ampicilline	22
Figure 6	Structure de Carbénicilline et Ticarcilline	23
Figure 7	Structure de la mezlocilline, la pipéracilline et l'azlocilline	23
Figure 8	Structure de pivmecillinam	23
Figure 9	Structure chimique des β -inhibiteurs	24
Figure 10	Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases	24
Figure 11	Structure des céphèmes	25
Figure 12	Structure des monobactames	25
Figure 13	Structure de Carbapénème	26
Figure 14	Structure chimique de fosfomycine	26
Figure 15	Structure des tétracyclines	27
Figure 16	Structure du chloramphénicol et thiamphénicol	27
Figure 17	Structure de rifampicine	27
Figure 18	Structure des sulfamides	28
Figure 19	Structure des quinolones	28
Figure 20	Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négative	31
Figure 21	Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux.....	35
Figure 22	Méthode de dilution en milieu liquide.....	42
Figure 23	Méthode d'E-test.....	42
Figure 24	Souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de β -lactamase à spectre élargi (bouchon de champagne).....	44
Figure 25	Test de Hodge modifié	46

Tableaux		Pages
Tableau I	Utilisation des milieux d'enrichissement sélectif liquide pour les entérobactéries	6
Tableau II	Couleur des colonies sur la gélose Drigalski	7
Tableau III	Caractéristiques des colonies des entérobactéries isolées des milieux ensemencés en bactériologie	9
Tableau IV	Principaux caractères d'identification biochimique des genres <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>	10
Tableau V	Caractères biochimiques des genres <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Yersinia</i>	11
Tableau VI	Caractères biochimiques de <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> et <i>Morganella</i>	12
Tableau VII	Caractères d'identification biochimique du <i>Salmonella</i> et <i>Citrobacter</i>	12
Tableau VIII	Exemple des différents sérotypes d' <i>Escherichia coli</i>	13
Tableau IX	Pouvoir pathogène d' <i>E. coli</i> pour l'homme	15
Tableau X	Les différences entre les salmonelloses typhoïdes et entériques	16
Tableau XI	Quelle que molécules appartenant aux différents groupes des β -lactames	21
Tableau XII	le spectre d'activité des différents groupes d'antibiotiques de la famille de β -lactamines	29



INTRODUCTION
Générale

Introduction

Les entérobactéries sont les causes les plus fréquentes d'infections communautaires ou nosocomiales. Elles sont traitées par différents antibiotiques, mais le plus souvent par les β -lactamines ou encore les fluoroquinolones. Par ailleurs, suite à l'utilisation abusive de ces molécules, les bactéries ont développés une importante résistance vis-à-vis de ces antibiotiques, en utilisant des capacités à produire des mécanismes divers.

L'émergence et la diffusion dans des populations humaines hospitalisées ou non de ces bactéries pathogènes et résistantes, est devenue un problème de santé et d'antibiothérapie. La résistance bactérienne aux antibiotiques pose deux problèmes au médecin clinicien : choisir un antibiotique actif sur la bactérie pathogène et éviter un échec thérapeutique de la sélection de mutants résistants (Kang *et al.*, 2005 ; Belmonte *et al.*, 2009).

Dans les cas où l'infection a été documentée bactériologiquement, le traitement est ajusté dans un second temps, si nécessaire, en fonction des résultats fournis par le laboratoire. Une meilleure connaissance des mécanismes de résistances des entérobactéries et de leur traitement peut améliorer le pronostic des patients et diminuer la pression de sélection des antibiotiques, et peut avoir une meilleure prise en charge.

Ces résistances acquises ne peuvent être mises en évidence que par des tests au laboratoire. Il est donc, nécessaire d'évaluer *in vitro* la sensibilité aux antibiotiques afin d'aider le clinicien dans son choix thérapeutique, lors d'un traitement probabiliste, le médecin doit connaître non seulement l'étiologie la plus probable mais aussi l'épidémiologie c'est-à-dire les fréquences de résistance pour la majorité des espèces rencontrées.

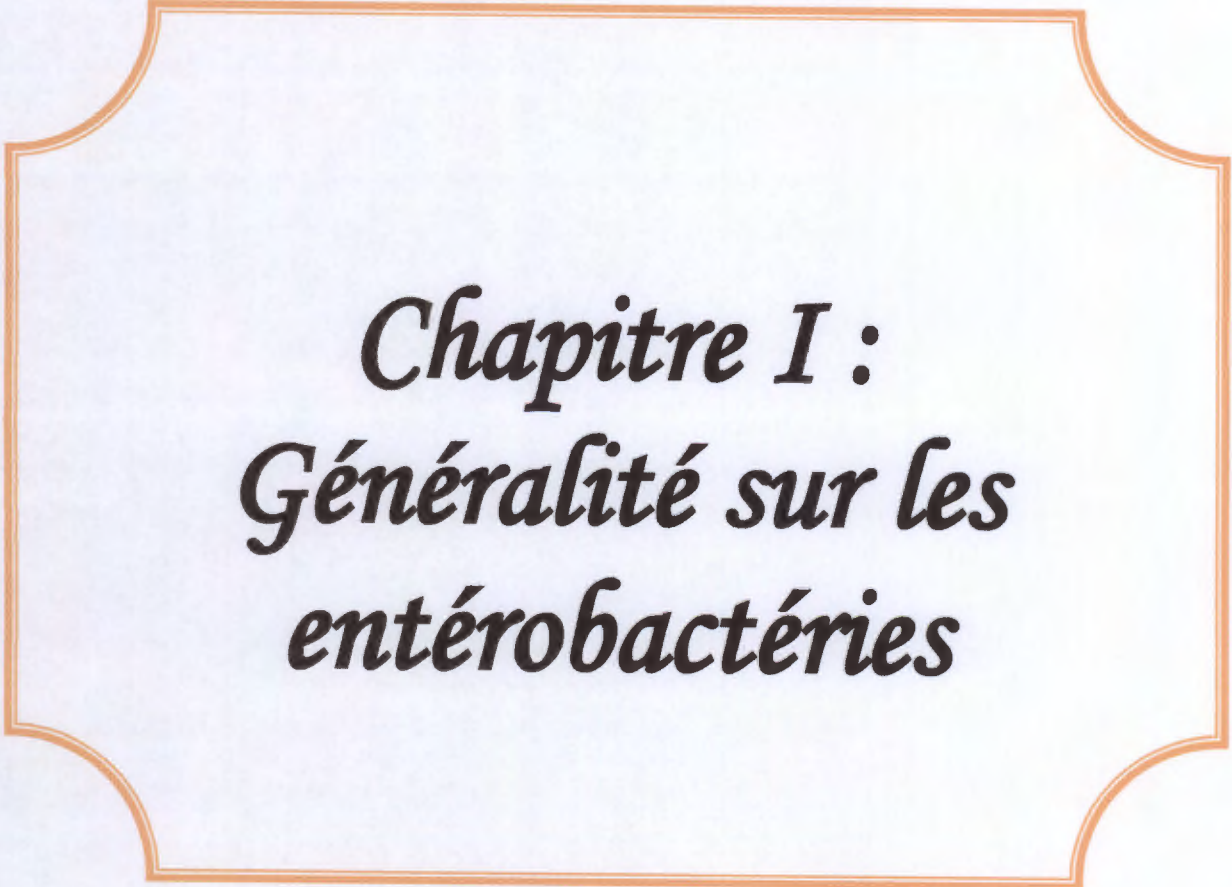
L'objectif de ce mémoire est de faire une étude sur les différentes méthodes utilisées *in vitro* pour déterminer l'état des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques et détecter les mécanismes par lesquels ces bactéries exercent la résistance.

Ce mémoire s'articule autour de trois chapitres :

Dans le premier chapitre nous donnons un aperçu général sur les entérobactéries et les principales maladies qu'elles causent.

Le deuxième chapitre se discute sur les antibiotiques et leur classification ainsi le mode d'action et de résistance des entérobactéries.

Dans le troisième chapitre, nous présentant les différentes méthodes utilisées pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.



Chapitre I :
Généralité sur les
entérobactéries

I.1. Définition

La famille des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*) regroupe de nombreuses espèces dont la plupart sont des hôtes normaux (commensaux) de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils correspondent à un groupe relativement homogène au niveau phylogénétique (Guiraud, 2003 ; Madigan et Martinko, 2007).

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs :

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long et de 0,3 à 1 µm de large ;
- Mobiles par flagelles péritriches, ou immobiles ;
- Non sporulés ;
- Aérobie anaérobies facultatifs ;
- fermentent le glucose ;
- Catalase positive ; oxydase négative ;
- Réduisent habituellement les nitrates en nitrite (pas en N₂) ;
- Possédant un ARN 16S (adénosine ribonucléique 16S) de Gamma-protéobactéries.
- Les *Enterobacteriaceae* ont un G+C % du DNA compris entre 38 et 60 mol % entraîné la distinction de nouveaux genres et de nouvelles espèces dont beaucoup n'ont pas de pouvoir pathogène défini (Avril *et al.*, 1992 ; Madigan et Martinko, 2007).

I.2. Classification

I.2.1. Classification de Bergey (Bergey, 1994)

- Embranchement : Gracilicutes (Gram négative).
- Groupe 5 : bâtonnets anaérobies facultatifs, Gram négative.
- Famille des *Enterobacteriaceae*.
- 30 Genres.

I.2.2. Classification phylogénique

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre des enterobactériales.
- Famille des *Enterobacteriaceae*.
- 44 genres (Bergey's Manual, 2004) dont les genres récents *Alterococcus*, *Arsenophorus*, *Brenneria*, *Pectobacterium*, *Raoultella*, *Samsonia*, *Sodalis* (Delarras, 2007).

I.2.3. Les différentes tribus des *Enterobacteriaceae*

Les entérobactéries constituent une famille de bactérie très importante comportant de nombreux genres subdivisés eux-mêmes en espèces. Les genres de cette famille sont regroupés en six tribus, d'après leurs propriétés fermentatives : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Salmonellae*, *Proteae*, *Yersinia*, *Erwiniae* (Nauciel et Vildé, 2005 ; Delarras, 2007).

I.2.3.1. Tribu *Salmonellae* : *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*

❖ Genre *Salmonella*

Le nom *Salmonella* a été donné par Lignières (1990) à ce groupe bactérien. Ce nom fut choisi en l'honneur de Salmon (Le Minor et Véron, 1989).

Deux espèces sont identifiées dans le genre *Salmonella* : *S. enterica* et *S. bongori*. *S. enterica* a été subdivisé en six sous-espèces :

- | | |
|--------------------|--|
| ✓ Sous-espèce I | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> |
| ✓ Sous-espèce II | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>salamae</i> |
| ✓ Sous-espèce IIIa | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>arizonae</i> |
| ✓ Sous-espèce IIIb | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i> |
| ✓ Sous-espèce IV | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>houtenae</i> |
| ✓ Sous-espèce V | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>bongori</i> |
| ✓ Sous-espèce VI | <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>indica</i> (Porwollik, 2011). |

❖ Genre *Citrobacter*

En 1958, le sous-comité international sur la taxonomie des *Enterobacteriaceae* a approuvé le nom du *Citrobacter freundii* pour ce groupe de bactéries hétérogène. Plus tard, deux groupes de bactéries qui étaient semblables au *C. freundii* ont été identifiés et incluses dans le genre *Citrobacter*, sous le nom de *Citrobacter koseri* et *Citrobacter amalonaticus*. En plus de *C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, cinq nouvelles espèces *C. farmer*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmani* et *C. sedlakii* ont été identifiées (Dworkin et al., 2006).

❖ Genre *Edwardsiella* : *Edwardsiella* est parfois classée dans une tribu à part (*Edwardsiellae*). Ce genre comprend Une seule espèce c'est *E. tarda* (Guiraud, 2003).

I.2.3.2. Tribu *Escherichiae* : *Escherichia*, *Shigella* : ces deux espèces sont apparentées sur la base de l'homologie d'ADN (adénosine désoxyribonucléique) (Guiraud, 2003).

❖ Genre *Escherichia* : le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, qui a été isolé de blattes (ou cafards), mais la plus importante espèce est *Escherichia coli* qui a été isolée la première fois dans les déchets de l'enfant en 1885 par le pédiatre autrichien l'odeur Echerich (Guiraud, 2003 ; Dworkin et al., 2006).

❖ Genre *Shigella* : ces bactéries furent décrites la première fois par Chantemesse et Widal en 1888. Ils avaient isolées de selles de malades présentant un syndrome dysentérique. Dans le genre *Shigella*, la division en quatre espèces est basée sur les caractères biochimiques et antigéniques. Les différents sérotypes sont liés à la possession d'antigènes O et K (Le Minor et Véron, 1989 ; Nauciel et Vildé, 2005).

- groupe A (10 sérotypes) : *Shigella dysenteriae* ou bacille de Shiga ;
- groupe B (6 sérotypes) : *Shigella flexnerii* ;
- groupe C (15 sérotypes) : *Shigella boydii* ;
- groupe D (1 sérotypes) : *Shigella sonnei* (Guiraud, 2003).

I.2.3.3. Tribu *Klebsielleae*: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*

❖ Genre *Klebsiella*

Le genre *Klebsiella* dans la famille des *Enterobacteriaceae* a été appelé par Trevisan en 1885 pour honorer le microbiologiste allemand Edwin Klebs (Dworkin *et al.*, 2006).

La classification des différentes espèces de *Klebsiella* est discutée. Néanmoins 6 espèces sont usuellement connues :

- Quatre espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*.
- Deux espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes, ce sont *K. terrigena* et *K. planticola* (Avril *et al.*, 1992).

❖ Genre *Enterobacter* : *Enterobacter* anciennement appelé *Aerobacter* comprend plusieurs espèces : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*, et *E. asburiae*, dont *E. cloacae* et *E. aerogenes* présentent un intérêt clinique pour l'homme (Gouraud et Van Gompel, 2000).

❖ Genre *Hafnia* : le genre *Hafnia* a été identifié par Moller (1954). Ce genre est formé d'une seule espèce, *Hafnia alvei*, antérieurement désignée comme *Enterobacter alvei* (Dworkin *et al.*, 2006).

❖ Genre *Serratia* :

Un événement s'est produit en 1264 où le sang s'est égoutté sur la robe longue d'un prêtre. L'événement plus tard a été célébré par Rafael dans son fresque "The Mass of Bolsena". C'est jusqu'en 1819 que Bartholemeo Bizio un pharmacien Italien a démontré que les miracles sanglants ont été provoqués par une organisation vivante, il l'a appelé *Serratia* (Pommerville, 2009).

Le genre *Serratia* comprend les espèces suivantes : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. proteomaculans*, *S. grimesii*, *S. rubidaea*, *S. fonticola*, *S. plymuthica*, *S. ficaria*, *S. odorifera*, *S. entomophila* (Pommerville, 2009).

I.2.3.4. Tribu *Proteae*: *Proteus*, *Providencia*

Les travaux de taxonomie basés sur les réactions d'hybridation d'ADN ont montré que : les souches antérieurement désignées comme *Proteus morganii* n'appartiennent pas au genre *Proteus*. Elles forment le genre *Morganella*. Les souches désignées comme *Proteus rettgeri* doivent être classées dans le genre *Providencia* (Avril *et al.*, 1992).

❖ Genre *Proteus* : Comporte quatre espèces : *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, et *P. myxofaciens*. Cette dernière n'a pas d'intérêt médical (Avril *et al.*, 1992).

❖ **Genre *Providencia*** : Ce genre comporte quatre espèces : *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* et *P. rustigianii* (proche de *P. alcalifaciens*) (Avril *et al.*, 1992).

I.2.3.5. Tribu *Yersinia*

❖ **Genre *Yersinia***

Proposée par Van Loghem en 1944, le genre *Yersinia* a été officialisé en 1974, après le démembrement du genre *Pasteurella* dans lequel étaient jusqu'alors rassemblées, avec les *Pasteurella stricto sensu*, *P. pseudotuberculosis* type «B» (future *Yersinia enterocolitica*). En 1974, le genre *Yersinia*, avec ces espèces, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, prend place parmi les *Enterobacteriaceae* dans la huitième édition du Bergey's Manual (Le Minor et Véron, 1989).

I.2.3.6. Tribu *Erwinia*

❖ **Genre *Erwinia*** : une autre tribu appelée *Erwinia*, est habituellement classée dans les *Enterobacteriaceae*. Elle constitue un seul genre ; *Erwinia*. Ces bactéries ne sont pas dangereuses au point de vue sanitaire (Guiraud, 2003).

I.3. Caractères culturels

Les *enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C.

Les formes *S* (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène (Avril *et al.*, 1992).

Les formes *R* (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes *R* donnent un aspect grumeleux (Avril *et al.*, 1992).

Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Cet aspect peut être rencontré de manière exceptionnelle dans d'autres genres : (*Escherichia*, *Salmonella*, ...). Elles ont alors après 24h d'incubation un diamètre double de celui des colonies habituelles qu'il peut dépasser 10 mm, une tendance à la confluence (Avril *et al.*, 1992; Le Minor et Véron, 1989).

Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (Avril *et al.*, 1992).

La plupart d'espèces des entérobactéries se développent sur milieu minimal sans facteur de croissance (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, la plupart des *Salmonella*). Mais comme il est de règle en bactériologie, les bactéries adaptées à un hôte pour laquelle elles ont un pouvoir pathogène manifeste (*Shigella*, *Salmonella typhi*...) exigent pour leur croissance un ou plusieurs facteurs de croissance (Le Minor et Véron, 1989).

Le temps de division moyen des entérobactéries varie de 20 à 40 min. Sur milieux ordinaires liquides, le maximum de culture est donc atteint habituellement en moins de 24 heures d'incubation (Le Minor et Véron, 1989).

I.3.1. Milieux de culture usuels pour les entérobactéries

I.3.1.1. Milieu d'enrichissement sélectif liquide

Les milieux d'enrichissement sélectifs sont des milieux de culture utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentiel aux bactéries présentes dans des flores (Denis *et al.*, 2007).

Le tableau I représente les milieux d'enrichissement pour les entérobactéries.

Tableau I. Utilisation des milieux d'enrichissement sélectif liquide pour les entérobactéries (Delarras, 2007).

Milieux	Utilisations
Bouillon lactosé	<ul style="list-style-type: none">- diluant des produits pharmaceutiques non stériles pour la recherche des entérobactéries et autres bacilles Gram négatives.- diluant pour la recherche d'<i>Escherichia coli</i> et <i>Salmonella</i>- milieu de culture pour l'étude de la fermentation du lactose par les bactéries ne présentant pas d'exigence particulière.
Bouillon Mossel	<ul style="list-style-type: none">- enrichissement des entérobactéries et autres bacilles Gram négatives recherchées dans des produits pharmaceutiques non stériles.

I.3.1.2. Milieux d'isolements sélectifs

➤ Gélose Drigalski

La gélose Drigalski est un milieu d'isolement sélectif et de différenciation destiné à la recherche des entérobactéries et autres bacilles Gram négatives (*Pseudomonas*) à partir des prélèvements cliniques. Ce milieu est composé par le peptone de gélatine, extrait de viande, extrait de levure, désoxycholate de sodium, thiosulfate de sodium, lactose, cristal violet, bleu de bromothymol et l'agar (Delarras, 2007).

La couleur des colonies développées sur la gélose Drigalski des différentes espèces est présentée dans le tableau II :

Tableau II. Couleur des colonies sur la gélose Drigalski (Delarras, 2007).

Couleur des colonies	Lactose	Espèce bactérienne
Jaune à jaune-vert Précipité possible de sels biliaire autour des colonies	Positive	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter...</i>
Bleu, vert ou bleu-vert	Négative	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Proteus</i>

- milieu VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et ou rouge neutre)

C'est un milieu sélectif pour les entérobactéries. Il est utilisé dans les recherches obligatoires des entérobactéries pour vérifier les conditions d'hygiène du process pour certains produits.

Dans ce milieu, les entérobactéries fermentent toutes le glucose et vont se différencier par un rougissement du milieu et de la colonie par production d'acide et virage du rouge neutre (Branger *et al.*, 2007).

- La gélose Rambach

Le désoxycholate de sodium qu'elle contient inhibe la croissance des bactéries Gram positives. Ce milieu permet un bon repérage des colonies de *Salmonella* par la lecture de deux caractères biochimiques : l'oxydation du propylène glycol et la β - galactosidase. Les colonies de *Salmonella* sont rouges alors que celle des autres entérobactéries sont bleu violette (coliformes) ou incolore (*Proteus*, *S. typhi* et *S. paratyphi A*) (Leyral, 2002).

I.3.1.3. Milieux de culture pour *Salmonella* et *Shigella*

- Bouillon d'enrichissement au sélénite selon Leifson.

Le bouillon d'enrichissement au sélénite selon Leifson (1936) est un milieu nutritif liquide destiné à l'enrichissement des Salmonelles et éventuellement de *Shigella sonnei* contenues des prélèvements biologiques (selles, urines), dans les eaux, dans des denrées alimentaires...(Delarras, 2007).

- Bouillon MKTTn

Le bouillon MKTTn (Muller-Kaufmann tetrathionate novobiocine) est un bouillon d'enrichissement destiné à l'enrichissement sélectif des *Salmonella* lors de leur recherche dans les produits alimentaires (Delarras, 2007).

➤ Gélose XLD (xylose, lysine, desoxycholate)

La gélose XLD est un milieu d'isolement sélectif et de différenciation pour la recherche :

- Des *Salmonella* et des *Shigella* à partir de prélèvement biologiques (selles) en bactériologie médicale ;
- Des *Salmonella* dans les produits pharmaceutiques et dans les aliments (Delarras, 2007).

Les différentes colonies, pouvant être observée sur la gélose XLD, sont les suivants :

- ✚ Les colonies de *Salmonella* sont rose à rouge avec ou sans centre ;
- ✚ Les colonies de *Shigella* sont rose à rouge sans centre noir ;
- ✚ Les colonies jaunes ou orange (sucre positif) correspondent à d'autres entérobactéries (Delarras, 2007).

➤ La gélose au sulfite de bismuth

Les agents sélectifs sont le vert brillant et le bismuth. Les *Salmonella* donnent dans ce milieu des colonies brunes ou noires (*Salmonella* H₂S positif), certaines espèces donnent des colonies vertes (*Salmonella* H₂S négatif) (Leyral, 2002).

I.3.1.4. Autre milieux de culture

D'autres milieux de cultures peuvent être utilisés pour les entérobactéries. Certains d'eux sont des milieux sélectifs pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella*, ce sont la gélose Hektoen et la gélose *Salmonella Shigella*, les autres sont des milieux sélectifs pour l'isolement des entérobactéries (Denis *et al.*, 2007).

Le tableau ci-dessous représente le caractère des colonies sur ces milieux.

I.4. Caractères biochimiques

Comme les bactéries entériques ont une morphologie très semblable, il utilise des tests biochimiques pour les identifier après un examen préalable de leur morphologie, de leur mobilité et de leur croissance, dont les diverses propriétés biochimiques utilisés pour distinguer les différents genres des bactéries entériques (Prescott *et al.*, 2003).

➤ *Klebsiella, Enterobacter, Serratia*

Dans le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, dit K.E.S., sont rassemblées des *Enterobacteriaceae* qui ont en commun les caractères suivants :

- ☞ La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive.
- ☞ Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes.
- ☞ Ces espèces sont souvent multi résistantes aux antibiotiques (Avril *et al.*, 1992).

Les principaux caractères biochimiques de ces genres sont donnés dans le tableau IV :

Tableau IV. Principaux caractères d'identification biochimique des genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (Avril *et al.*, 1992).

Les principaux caractères biochimiques			Principaux caractères distinctifs entre les trois genres		
<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>
Toujours immobiles	VP (+)	Mobile	Mobilité (-)	+	+
ODC, ADH, TDA, lipase H ₂ S ; négatifs	Mobilité	VP (+)	ODC (-)	+	(+)
	ODC (+)	ONPG (+)	ADH (-)	d	-
	Parfois une ADH	ADH, TDA, uréase, H ₂ S sont négatifs	DNase (-)	-	+
	Uréase (-)		Gélatinase (-)	-	+
	TDA, DNase, production d'indole et H ₂ S sont négatifs				

ADH : arginine dihydrolase ; ODC : ornithine décarboxylase ; TDA : tryptophane désaminase; ONPG : orthonitrophényl-β-galactoside, () = exception ; d = caractère variable.

➤ ***Shigella, Escherichia coli, Hafnia, Yersinia***

Les caractères biochimiques de ces quatre espèces sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau V. Caractères biochimiques des genres *Shigella, Escherichia coli, Hafnia, Yersinia* (Le Minor et Véron, 1989 ; Avril *et al.*, 1992).

<i>Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia (H. alvei)</i>	<i>Yersinia</i>
Immobilité ; H ₂ S ; et LDC ; Citrate de Simmons ; gaz ; et uréase sont (-).	Indole ; ONPG ; mannitol ; Mobilité, LDC ; ODC ; Sorbitol ; et gaz sont (+). Inositol, urée, TDA, VP, gélatinase, et Citrate de Simmons sont (-)	VP + à 22°C, Mobilité à 22°C LDC; ODC; ONPG; arabinose et mannitol sont (+)	Mobile à T° <29°C, Uréase et ONPG sont (+), LDC ; ADH ; PDA ; H ₂ S ; Citrate de Simmons sont (-)

LDC : lysine décarboxylase ; PDA : phénylalanine désaminase.

➤ ***Proteus, Providencia, Morganella***

Ce groupe d'*Enterobacteriaceae* rassemble des espèces qui ont en commun des enzymes permettant la désamination oxydative des acides aminés en corps cétoniques.

Deux de ces enzymes sont recherchées en pratique courante. Ce sont :

- ✧ Le tryptophane désaminase.
- ✧ La phénylalanine désaminase.

Ce groupe de bactéries sera désigné comme «entérobactéries TDA positive». C'est un groupe très hétérogène. Ces bactéries sont en général mobiles, donnent des colonies lactose négatif et sont ONPG négatif (Avril *et al.*, 1992).

Les caractères biochimiques de ce groupe sont cités dans le tableau VI (Leyral, 2002).

Tableau VI. Caractères biochimiques de *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*

(Leyral, 2002).

	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Morganella</i>
Uréase	(+)	(+)	(+)
Indol	(+)	(+)	(+)
TDA	(+)	(+)	(+)
H₂S	(+)	(-)	(-)
ONPG	(-)	(-)	(-)
Gaz	(+)	(+)	(+)
Mobilité	(+)	(-)	(+)
LDC	(-)	(-)	(-)
Saccharose	(+)	(+)	(-)

➤ ***Salmonella* et *Citrobacter***

Les caractères biochimiques d'identification des *Salmonella* et *Citrobacter* sont représentés dans le tableau ci-dessous

Tableau VII. Caractère d'identification biochimique du *Salmonella* et *Citrobacter*

(Avril *et al.*, 1992 ; Federighi, 2005).

<i>Salmonella</i>	Uréase ; TDA ; VP ; lactose ; Saccharose ; l'inositol ; l'adonitol ; et l'H ₂ S sont (-). LDC ; ODC ; et Citrate de Simmons (+).
<i>Citrobacter</i>	Citrate ; glucose ; gaz ; mobilité ; ONPG sont (+) VP ; et LDC sont (-)

I.5. Caractères antigéniques

Les Entérobactéries sont bien connues au point de vue immunologique. Ils possèdent au niveau de leur paroi un lipopolysaccharide qui porte sur sa partie polysaccharidique des antigènes appelés "O" somatiques. Les flagelles portent des spécificités immunologique appelées "H". Certaines espèces possèdent aussi des antigènes capsulaires de nature polysaccharidique (antigènes K). Tous ces antigènes sont de structure très variable. Ils servent ainsi à définir des sérovars (ou sérotypes) à l'intérieur d'une espèce (Guiraud, 2003 ; Nauciel et Vildé, 2005).

✓ Les antigènes Kunin

La plupart des espèces d'entérobactéries possèdent un antigène commun couramment appelé antigène de Kunin ou ECA (Enterobacterial Common Antigen), ce dernier à un intérêt taxonomique (Le Minor et Véron, 1989 ; Avril *et al.*, 1992).

Sa présence dans une culture est mise en évidence par l'agglutination des antisérums dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant la méthode de l'absorption spécifique des anticorps de Castellani.

Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinas. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que des anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène (Le Minor et Véron, 1989 ; Avril *et al.*, 1992).

✓ Les antigènes O

Ce sont des antigènes thermostables et résistent à l'alcool ou l'acide. Avec l'antigène O, l'agglutination est granulaire, fine lent à apparaître et difficile à dissocier (Meyer *et al.*, 2004).

✓ Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Les réactions d'agglutination ou ils interviennent se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation (Avril *et al.*, 1992).

✓ Les antigènes K

Les antigènes de morphologie et de nature très diverses, entourant l'antigène O sont désignés sous le nom général d'antigènes K. Certaines constituent une capsule visible au microscope, comme celui des *Klebsiella* ou de certains *E. coli*, d'autre ont reçu le nom d'antigène d'enveloppe parce que leur structure n'est pas visible au microscope optique, mais se comporte cependant comme si elle entourait la bactérie, rendant l'antigène de paroi (O) inagglutinable (Le Minor et Véron, 1989).

Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *Escherichia coli* et l'antigène Vi (virulence) de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99) (Avril *et al.*, 1992).

Dans le tableau suivant quelques exemples de sérotypes d'*E. coli*.

Tableau VIII. Exemple des différents sérotypes d'*E. coli* (Guiraud, 2003).

	Antigènes O	Antigènes K	Antigènes H
<i>E. coli</i>	EPEC: O6, O8.	Antigènes CFA.	Importants pour les ECEH dont le sérotype le plus courant est O157 :H7

Tableau IX. Infections intra-intestinales dues à *E. coli* (Avril *et al.*, 1992).

Infection extra-intestinale		
Infection urinaire	Méningites néo-natales	Suppurations diverses
Les souches provenant de la flore fécales contaminent les urines par voie ascendante.	La plupart des souches en cause possèdent un antigène poly-saccharidique de type K1, dont la composition est proche de celle capsulaire de <i>Neisseria meningitidis</i> de type B.	Les <i>E. coli</i> de la flore fécale peuvent être en cause dans des péritonites des cholécystites, des salpingites et des suppurations post-opératoires. Toutes ces infections peuvent être à l'origine de septicémie.

I.6.2. Genre *Shigella*

Entérobactérie dont l'homme est le seul réservoir. La contamination est oro-fécale. La manifestation clinique de *Shigella* est la dysenterie bacillaire qui est le modèle de la diarrhée invasive. La diarrhée sanguinolente s'accompagne de douleurs abdominales très fortes et une fièvre élevée (39-40°C). Parmi les quatre espèces de *Shigella*, *S. dysenteriae* et à un degré moindre *S. flexneri* sont les formes les plus pathogènes et peuvent entraîner des formes sévères avec manifestation intestinal très forte. Leur pouvoir pathogène est la capacité d'envahir l'épithélium et induire une réaction inflammatoire de la muqueuse (Vaubourdelle, 2007).

Un second pouvoir pathogène des Shigelles est la production d'une toxine cytotoxique qui est synthétisée à un taux important seulement par *Shigella dysenteriae* sérovar « 1 » appelé "shiga toxine". Les localisations extra-digestives sont peu fréquentes. Les moins rares sont les infections urinaires. On observe parfois des formes septicémiques, des arthrites ou des méningites (Avril *et al.*, 1992 ; Vaubourdelle, 2007).

I.6.3. Genre *Salmonella*

Les *Salmonella* sont présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux et présentent des variations importantes de pathogénicité en fonction de la nature de l'hôte (Guiraud, 2003).

Il en existe deux types selon leur pathogénie : les Salmonelles typhiques (*Salmonella* sérotype typhi et *Salmonella* sérotype paratyphi A, B et C) provoquant des bactériémies (fièvres typhoïdes) et les salmonelles non typhiques responsables de gastro-entérites. Ces dernières sont très ubiquitaires et nombreuses, dont *S. sérotype typhimurum*, *S. sérotype enteritidis*.... Les Salmonelles responsables d'infection urinaires, cholécystites, méningites, ostéomyélites et infections pulmonaires sont très rares (Avril *et al.*, 1992 ; Vaubourdelle, 2007).

Tableau X. Les différences entre les salmonelloses typhoïdes et entériques (Kayser *et al.*, 2005).

Paramètres	Salmonelloses typhoïde	salmonelloses entérique
Spectre d'infection	Humains	Animaux et humains
Source d'infection	Personnes infectés,	porteurs chroniques
Mode d'infection	Oral	Oral
Transmission	Indirect : l'eau, contaminations alimentaires Direct : infection de souillure	Indirect : contaminations alimentaires.
Dose infectante	10 ² -10 ³ bactéries	>10 ⁶ bactéries
Temps d'incubation	1-3 semaines	1-2 jours
Image clinique	Septicémie	Diarrhées aigu avec vomissement et fièvre.

I.6.4. Genre *Citrobacter*

Il s'agit d'un contaminant très courant, qui n'est qu'exceptionnellement entérotoxique (diarrhée, crampes abdominales, vomissements, gastro-entérites infantiles (Guiraud, 2003).

I.6.5. Genre *Edwardsiella*

Les infections avec *E. tarda* peuvent être divisées en deux types : intestinal et extra-intestinal. L'infection gastro-intestinale cause habituellement une entérite limitée par individu sécréteur avec la diarrhée aqueuse intermittente et la fièvre de qualité inférieure. L'infection de blessure est l'infection extra-intestinal la plus commune (Mc Millan *et al.*, 2006).

La septicémie avec *E. tarda* est une complication rare mais sérieuse typiquement vue dans les patients présentant l'affection hépatique, la surcharge de fer, ou la suppression immunisée. Elle présente avec la fièvre élevée, le choc, et la coagulation intravasculaire disséminée et porte un taux de mortalité approximativement de 45% (Mc Millan *et al.*, 2006).

I.6.6. Genre *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae, et *Klebsiella oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (Avril *et al.*, 1992)

I.6. Habitat et pouvoir pathogène

Comme leur nom l'indique, les entérobactéries sont pour la plupart des bactéries qui colonisent l'intestin (le côlon essentiellement), mais cette localisation n'est pas exclusive chez l'homme et les animaux, elles peuvent être isolés du sol et des végétaux qui sont même le gîte habituel de certaines espèces. En dehors du tube digestif, elles peuvent être transitoirement présentes sur différentes parties du revêtement cutanéomuqueux (Le Minor *et al.*, 1989 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Certaines souches causent des gastroentérites ou des infections de voies urinaires. Plusieurs genres entériques contiennent des pathogènes humains très importants responsable de divers maladies : *Salmonella*, la fièvre typhoïde et les gastro-entérites ; *Shigella*, la dysenterie bacillaire ; *Klebsiella*, la pneumonie ; *Yersinia* la peste (Prescott *et al.*, 2003).

Les autres bactéries de la famille des entérobactéries se comportent généralement comme des bactéries opportunistes souvent impliquées dans les infections nosocomiales, en particulier urinaires, parmi elles, on peut mentionner les genres *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Citrobacter*. La plupart de ces entérobactéries produisent des β -lactamases et sont résistantes à de nombreux antibiotiques (Nauciel et Vildé, 2005).

I.6.1. Genre *Escherichia* (*E. coli*)

Parmi tous les *E. coli* commensaux du tube digestive, seuls trois types de souches peuvent être responsables de diarrhées invasives : *E. coli* entéropathogènes (E.P.E.C) ; *E. coli* entéro-invasives (E.I.E.C) et *E. coli* entéro hémorragiques (E.H.E.C) (Rambaud *et al.*, 2004).

Les E.P.E.C représentent un agent bactérien très dominant incriminée dans les diarrhées infantiles, particulièrement dans les pays de développement.

Les E.H.E.C sont impliqués dans les infections d'origine alimentaire des pays industrialisés et induisent des colites hémorragiques qui peuvent être associées aux syndromes hémolytiques et urémiques.

La pathogénie des E.P.E.C et des E.H.E.C débute par l'adhésion à la muqueuse intestinale, et induit à la destruction des microvillosités avec la formation de fibre d'actine. La conséquence de ces changements est la disparition des fonctions barrière de l'entérocyte (Rambaud *et al.*, 2004).

Il existe un autre groupe important est celui des *E. coli* entérotoxigènes (E.T.E.C). Ils sont la principale cause des diarrhées aiguës en milieu tropical (en particulier chez les enfants) et la première cause de diarrhée des voyageurs (40-70%). La transmission est oro-fécale. Ces *E. coli* ont la capacité de se fixé tout le long de l'intestin grêle grâce à des adhésions spécifique et de libérer des entérotoxine ; entérotoxine LT (protéine thermolabile) et l'entérotoxine ST (thermostable) (Anglaret et Mortier, 2004 ; Vaubourdelle, 2007).

Les méningites et septicémies à *E. coli* surviennent surtout chez le nourrisson durant le premier moi de la vie (Le Minor et Véron, 1989).

Le tableau ci-dessous présente les différentes infections extra-intestinales causées par *E. coli*.

Tableau IX. Infections intra-intestinales dues à *E. coli* (Avril *et al.*, 1992).

Infection extra-intestinale		
Infection urinaire	Méningites néo-natales	Suppurations diverses
Les souches provenant de la flore fécales contaminent les urines par voie ascendante.	La plupart des souches en cause possèdent un antigène poly-saccharidique de type K1, dont la composition est proche de celle capsulaire de <i>Neisseria meningitidis</i> de type B.	Les <i>E. coli</i> de la flore fécale peuvent être en cause dans des péritonites des cholécystites, des salpingites et des suppurations post-opératoires. Toutes ces infections peuvent être à l'origine de septicémie.

I.6.2. Genre *Shigella*

Entérobactérie dont l'homme est le seul réservoir. La contamination est oro-fécale. La manifestation clinique de *Shigella* est la dysenterie bacillaire qui est le modèle de la diarrhée invasive. La diarrhée sanguinolente s'accompagne de douleurs abdominales très fortes et une fièvre élevée (39-40°C). Parmi les quatre espèces de *Shigella*, *S. dysenteriae* et à un degré moindre *S. flexneri* sont les formes les plus pathogènes et peuvent entraîner des formes sévères avec manifestation intestinal très forte. Leur pouvoir pathogène est la capacité d'envahir l'épithélium et induire une réaction inflammatoire de la muqueuse (Vaubourdelle, 2007).

Un second pouvoir pathogène des Shigelles est la production d'une toxine cytotoxique qui est synthétisée à un taux important seulement par *Shigella dysenteriae* sérovar « 1 » appelé "shiga toxine". Les localisations extra-digestives sont peu fréquentes. Les moins rares sont les infections urinaires. On observe parfois des formes septicémiques, des arthrites ou des méningites (Avril *et al.*, 1992 ; Vaubourdelle, 2007).

I.6.3. Genre *Salmonella*

Les *Salmonella* sont présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux et présentent des variations importantes de pathogénicité en fonction de la nature de l'hôte (Guiraud, 2003).

Il en existe deux types selon leur pathogénie : les Salmonelles typhiques (*Salmonella* sérotype typhi et *Salmonella* sérotype paratyphi A, B et C) provoquant des bactériémies (fièvres typhoïdes) et les salmonelles non typhiques responsables de gastro-entérites. Ces dernières sont très ubiquitaires et nombreuses, dont *S. sérotype typhimurium*, *S. sérotype enteritidis*.... Les Salmonelles responsables d'infection urinaires, cholécystites, méningites, ostéomyélites et infections pulmonaires sont très rares (Avril *et al.*, 1992 ; Vaubourdelle, 2007).

Tableau X. Les différences entre les salmonelloses typhoïdes et entériques (Kayser *et al.*, 2005).

Paramètres	Salmonelloses typhoïde	salmonelloses entérique
Spectre d'infection	Humains	Animaux et humains
Source d'infection	Personnes infectés,	porteurs chroniques
Mode d'infection	Oral	Oral
Transmission	Indirect : l'eau, contaminations alimentaires Direct : infection de souillure	Indirect : contaminations alimentaires.
Dose infectante	10 ² -10 ³ bactéries	>10 ⁶ bactéries
Temps d'incubation	1-3 semaines	1-2 jours
Image clinique	Septicémie	Diarrhées aigu avec vomissement et fièvre.

I.6.4. Genre *Citrobacter*

Il s'agit d'un contaminant très courant, qui n'est qu'exceptionnellement entérotoxique (diarrhée, crampes abdominales, vomissements, gastro-entérites infantiles (Guiraud, 2003).

I.6.5. Genre *Edwardsiella*

Les infections avec *E. tarda* peuvent être divisées en deux types : intestinal et extra-intestinal. L'infection gastro-intestinale cause habituellement une entérite limitée par individu sécréteur avec la diarrhée aqueuse intermittente et la fièvre de qualité inférieure. L'infection de blessure est l'infection extra-intestinal la plus commune (Mc Millan *et al.*, 2006).

La septicémie avec *E. tarda* est une complication rare mais sérieuse typiquement vue dans les patients présentant l'affection hépatique, la surcharge de fer, ou la suppression immunisée. Elle présente avec la fièvre élevée, le choc, et la coagulation intravasculaire disséminée et porte un taux de mortalité approximativement de 45% (Mc Millan *et al.*, 2006).

I.6.6. Genre *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae, et *Klebsiella oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (Avril *et al.*, 1992)

I.6.7. Genre *Enterobacter*

L'habitat normal des *Enterobacter* se situe dans l'eau ou dans le sol, mais la bactérie peut également rencontrer dans les voies respiratoires supérieures et le tractus intestinal des personnes saines (Gouraud Van Gompel, 2000).

Enterobacter est un pathogène opportuniste hospitalier dont la transmission se fait principalement par les mains du personnel soignant. Ces bactéries peuvent être responsables de septicémies, de méningites, d'infections urinaires, d'infection néonatales, des infections principalement des voies respiratoires et de suppurations diverses (Avril *et al.*, 1992 ; (Gouraud Van Gompel, 2000).

I.6.8. Genre *Serratia*

Les *Serratia* sont responsables d'infections hospitalières parfois épidémiques, particulièrement *Serratia marcescens*. La localisation de l'infection dépend de la nature de l'activité du service hospitalier : infections urinaires après manœuvres instrumentales ; infections respiratoires dues à l'emploi d'appareils de ventilation artificielle ou par aérosols ; surinfections des plaies par des antiseptiques contaminés ; septicémies compliquant les infections précédentes ou consécutives à l'usage de cathéters (Avril *et al.*, 1992).

En dehors des infections acquises à l'hôpital, des infections graves à *Serratia* (endocardites, ostéomyélites) ont été observées chez les héroïnomanes. *Serratia plymuthica* et *Serratia ficaria* n'ont pas de pouvoir pathogène connu pour l'homme (Avril *et al.*, 1992).

I.6.9. Genres *Proteus* et *Providencia*

Les *Proteus* sont des bactéries saprophytes très répandues dans le sol et dans les eaux ; elles ne sont pas très fréquentes dans l'intestin. Les *Proteus* et *Providencia* ne sont pas généralement, entéro-pathogènes. Cependant certaines souches possèdent des toxines, citant (*Proteus mirabilis* : hémolysine, neurotoxine et *Proteus morganii* : hémolysine). Ces bactéries sont responsables de troubles gastro-intestinaux (diarrhée, nausées, vomissements, crampes abdominales...) (Guiraud, 2003).

I.6.10. Genre *Yersinia*

Le genre *Yersinia* contient trois espèces d'importance médicale : *Yersinia pestis*, l'agent de la peste bubonique et pneumonique, *Yersinia pseudotuberculosis* et du *Yersinia enterocolitica*, qui peut avoir comme conséquence la gastroentérite grave, avec la formation d'abcès et la mort locales en raison de la péritonite (Barron, 1996).

Yersinia enterocolitica : la manifestation clinique la plus commune de l'infection humaine par *Yersinia enterocolitica* est l'entérocologie. Elle survient le plus souvent chez le jeune enfant et se traduit par une diarrhée, une fièvre habituellement modérée, des douleurs abdominales et parfois des vomissements. Les septicémies sont rares. Elles surviennent sur des sujets particuliers : immunodéprimés, patients ayant une surcharge en fer (Federighi, 2005 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Yersinia pseudotuberculosis : agent de la pseudo-tuberculose animale, provoque exceptionnellement l'homme des troubles gastro-intestinaux (vomissements, diarrhée, etc.) et / ou une adénite mésentérique (pseudo-appendicite) (Guiraud, 2003)

Yersinia pestis : *Yersinia pestis* ou bacille de Yersin, est l'agent de la peste, peut toucher les animaux et l'homme. Chez les animaux, les espèces sensibles, rongeurs essentiellement, succombent en 4 à 8 jours par septicémie après une maladie semblable à la peste humaine. Cette dernière se manifeste sous deux aspects ;

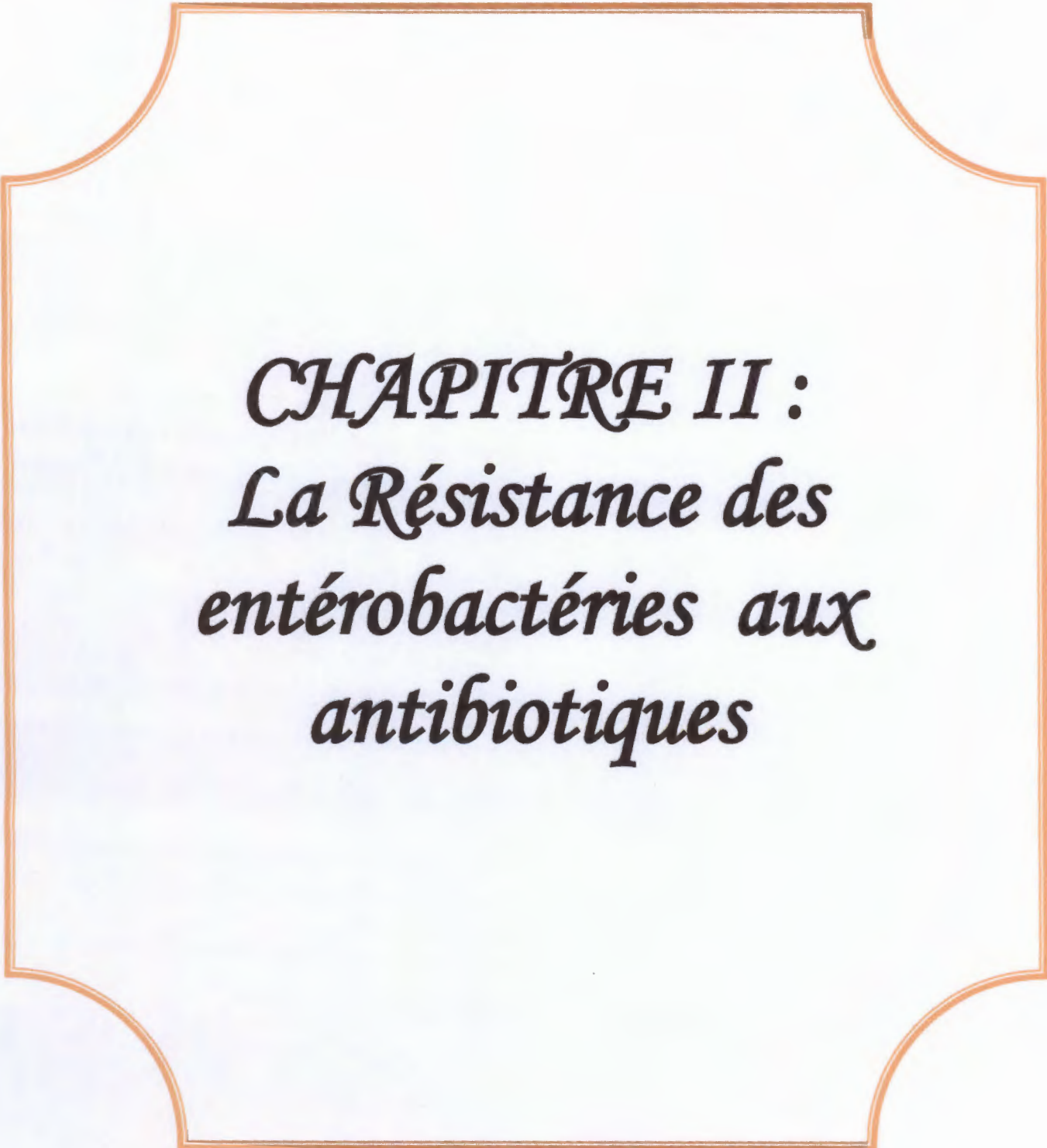
- *La peste bubonique ou bubo-septicémique* après quelque jour d'incubation, la maladie se traduit par une adénopathie inflammatoire dans le territoire de la pique infectante et un syndrome infectieux sévère. des localisations secondaires, notamment pulmonaires, peuvent survenir. La mortalité est importante.
- *La peste pulmonaire* cliniquement primitive ou pneumo-peste : à partir d'un sujet à atteinte pulmonaire, la transmission par voie respiratoire entraîne d'emblée une localisation pulmonaire. L'évolution est rapide avec une mortalité pratiquement de 100% (Le Minor et Véron, 1989 ; Nauciel et Vildé, 2005).

I.6.11. Genre *Erwinia*

Les *Erwinia* sont les seules bactéries phytopathogènes, peuvent se comporter en anaérobiose facultatifs. Les symptômes provoqués par les bactéries phytopathogènes sont très variés (Messiaen *et al.*, 1991).

On peut y distinguer :

- Les *Erwinia pectinolytiques* (= Pectinobactérium), se subdivisant en 2 espèces, *E. carotovora*, agent de pourritures d'organes charnus, et *E. chrysanthemi*.
- Les *Erwinia non pectinolytiques*, parmi lesquels on trouve soit de véritables parasites à spécificité parasitaire très accusée (ex : *E. tracheiphilia*), soit des saprophytes courants, comme *E. herbicola* (Messiaen *et al.*, 1991).



CHAPITRE II :
*La Résistance des
entérobactéries aux
antibiotiques*

Les antibiotiques représentent l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine, puisque c'est lorsqu'on est frappé par diverses maladies le praticien fait appel à ce type de médicament. Leur utilisation clinique, dès la fin de la première moitié du XX^e siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne (Thierry, 1994).

En 1877, Pasteur et Joubert avaient remarqué que certaines moisissures élaborent des substances empêchant le développement d'autres champignons. En 1912, Vandremmer montra que les extraits obtenus à partir de l'*Aspergillus fumigatus* avaient une activité anti-staphylococcique. En 1928, Fleming montra que le champignon *Penicillium notatum* produisait une substance bactériostatique agissant sur de nombreux microbes et inhibait le développement des bactéries : il venait de découvrir la pénicilline (Stora, 2010).

A la suite de la découverte de Fleming, de nombreux chercheurs étudièrent les produits de sécrétion d'un grand nombre de champignons. Puis, la constitution chimique des antibiotiques ayant été définie, on remplaça certains atomes dans les formules par des radicaux plus ou moins complexes. On constitua ainsi les antibiotiques hémi-synthétiques. On arriva ultérieurement à des antibiotiques de synthèse totale. Enfin, on peut faire fabriquer des antibiotiques après modifications génétiques de certaines bactéries (Stora, 2010).

II.1. Définition des antibiotiques

Pendant longtemps, on a appelé antibiotique (terme créé par Selman Waksman) toute substance chimique produite par un microorganisme, champignon (*Penicillium*, *Cephalosporium*), ou bactérie (*Bacillus* et surtout *Streptomyces*), pouvant inhiber la croissance ou détruire d'autres micro-organismes (Berche *et al.*, 1988).

Un antibiotique est donc défini comme une substance, d'origine biologique ou synthétique, agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (agents antibactériens) (Thierry, 1994).

II.2. Classification des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*

Il existe de nombreuses classifications en ce qui concerne les antibiotiques. Leur classification repose sur leur structure chimique et leur mécanisme d'action, l'origine, le mode d'administration, la répartition dans l'organisme (Le Minor et Vèron, 1989).

L'action antibactérienne de ces produits s'effectue selon quatre principaux mécanismes :

- ⊗ Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane (antibiotiques inhibant la synthèse des constituants de la paroi bactérienne) ;
- ⊗ Antibiotiques inhibant la synthèse protéique ;
- ⊗ Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques ;
- ⊗ Antibiotiques agissant sur les membranes (Berche *et al.*, 1988).

II.2.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Cette molécule n'existe que chez les bactéries et assure la rigidité de la paroi. Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance,

il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie (Nauciel et Vildé, 2005).

II.2.1.1. β -lactamines

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame (figure 1) (Cavallo *et al.*, 2004).

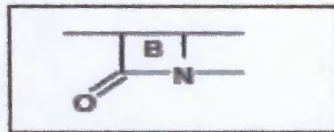


Figure 1. Cycle commun β -lactame (B) (Cavallo *et al.*, 2004).

On distingue quatre groupes :

- Les **pénames**, dont les pénicillines et les inhibiteurs de β -lactamases, comportant un cycle pentagonal saturé (figure2).
- Les **céphèmes**, correspondant aux céphalosporines, comportant un cycle hexagonal insaturé (figure2).
- les **monobactames**, dont la structure se limite à un seul cycle β -lactame (figure2).
- Les **pénèmes** (carbapénèmes) possédant un cycle pentagonal insaturé (figure2) (Duval et Soussy, 1990).

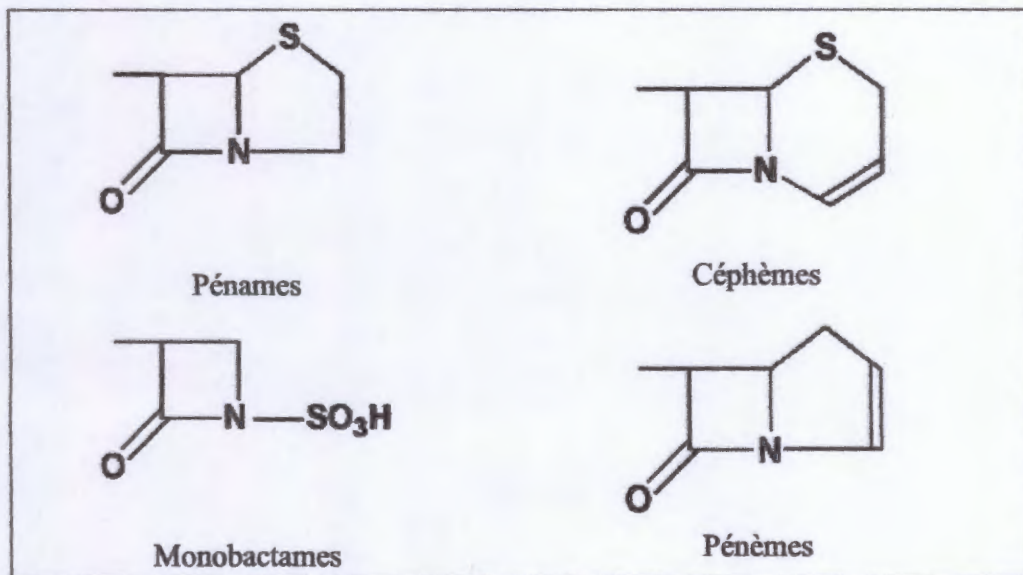


Figure 2. Structure chimique des β -lactamines : pénames, céphèmes, monobactames et pénèmes (Duval et Soussy, 1990).

Chaque groupe comporte plusieurs antibiotiques. Le tableau XI représente quelle que molécules appartenant aux différents groupes des antibiotiques de cette famille :

Tableau XI. Quelle que molécules appartenant aux différents groupes des β -lactames (Deboscker et Dubreuil, 2000).

Groupe	Produits
Les pénames	Pénicilline : péni G, V, M, Carboxypénicillines, Amidinopénicillines, Urédopénicillines, Aminopénicillines.
les céphèmes	Céphalosporines, Céfamycines : céfoxitine, céfotétan.
Les monobactames (azétidinones)	Aztréonam.
Les inhibiteurs irréversibles de β -lactamines (seul ou en association)	Acide clavulanique, Sulbactam, Tazobactam.
Les pénèmes	Carbapénèmes (oxapénèmes).

➤ *Les pénames*

- **Pénicillines** : Elles ont en commun un noyau (l'acide 6-aminopénicillanique) constitué par l'accolement de deux cycles : un cycle β -lactame et un cycle thiazolidine (**Figure 3**). Ce sont : la pénicilline G, la pénicilline M, les aminopénicillines (pénicillines A), les carboxypénicillines, les urédopénicillines, et les inhibiteurs de β -lactamases (**Duval et Soussy, 1990**)

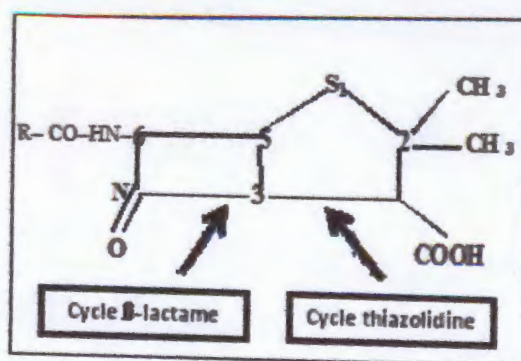


Figure 3. Structure des pénames (Berche *et al.*, 1988).

La méticilline (**figure 4**), ancien chef de file de pénicillines du groupe M. elle sert de référence pour classer les staphylocoques en deux catégories : les souches méti-S sensibles aux autres β -lactamines et les souches méti-R qui doivent être considérées comme résistantes à l'ensemble des β -lactamines (**Deboscker et Dubreuil, 2000**).

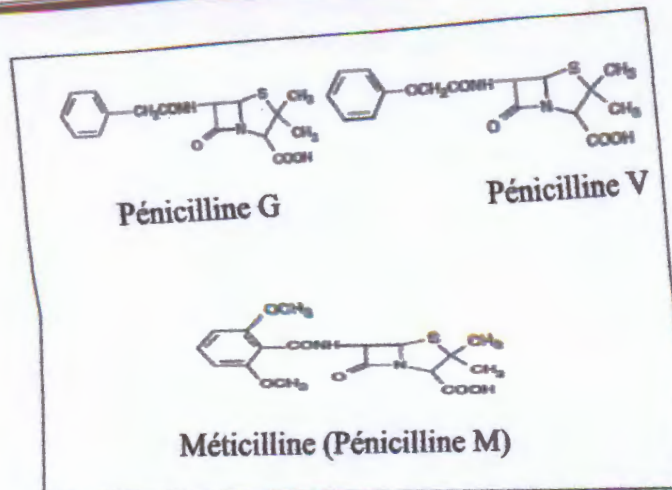


Figure 4. Structure des β -lactamines : pénicillines G, V et M (Cavallo *et al.*, 2004).

✓ Amino-pénicillines (pénicillines A)

Elles comprennent :

- ⇒ L'ampicilline, éventuellement associée au sulbactam ;
- ⇒ Les proampicillines, prodrogues de l'ampicilline, bacampiciline ;
- ⇒ Les analogues de l'ampicilline, éventuellement associée à l'acide clavulanique (Gaudy et Buxeraud, 2005).

La première des amino-pénicillines, l'ampicilline (figure 5), a été obtenue en modifiant la benzylpénicilline par le branchement d'un radical aminé (NH_2) sur sa chaîne latérale en position 6. Cette modification lui confère une meilleure stabilité en milieu acide et élargit le spectre d'activité à de nombreux bacilles, par rapport à la pénicilline G (vers certains bacilles à Gram négatif : *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella* (Cavallo *et al.*, 2004 ; Nauciel et Vildé, 2005).

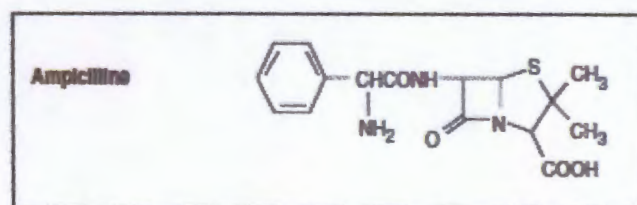


Figure 5. Structure de l'Ampicilline (Cavallo *et al.*, 2004).

✓ Carboxypénicillines

La première molécule de ce type fut la carbénicilline, puis a été remplacée par la ticarcilline. La présence d'un groupement benzyl différencie la carbénicilline de la ticarcilline qui a un groupement thiényl (Figure 6) (Cavallo *et al.*, 2004).

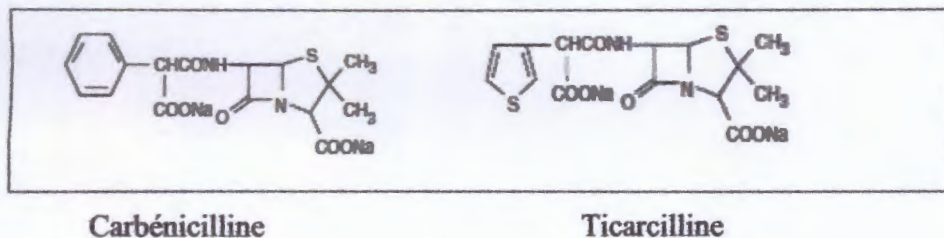


Figure 6. Structure de Carbénicilline et Ticarcilline (Cavallo *et al.*, 2004).

✓ **Urédopénicillines**

Elles comprennent principalement la mezlocilline la pipéracilline et l'azlocilline. Ces pénicillines ont en commun la substitution du groupement urée sur la chaîne latérale en C6 en position a de l'acide 6-amino-pénicillanique (Figure 7).

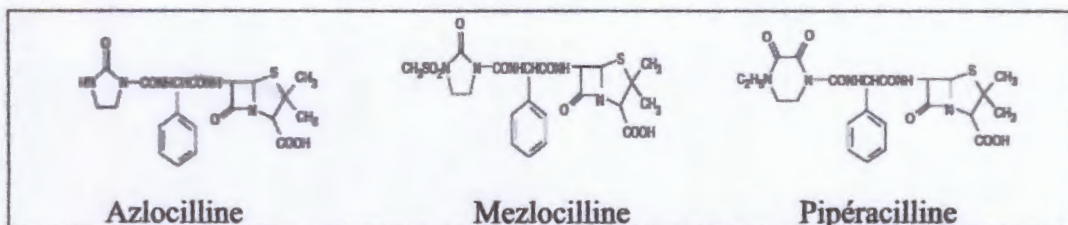


Figure 7. Structure de la mezlocilline, la pipéracilline et l'azlocilline (Cavallo *et al.*, 2004).

✓ **Amidinopénicillines**

On y trouve le pivmecillinam est la seule amidinopénicilline disponible. Ces molécules diffèrent des autres pénicillines par la substitution d'une liaison méthylène en C6 sur le noyau pénème (Nauciel et Vildé, 2005; Cavallo *et al.*, 2004).

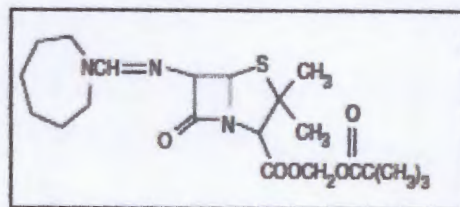


Figure 8. Structure de pivmecillinam (Cavallo *et al.*, 2004).

✓ **Inhibiteurs de β-lactamases (Pénicillines sulfones)**

Commençant vers la fin des années 80, trois inhibiteurs de β-lactamases (acide, sulbactam, et tazobactam clavulanique) ont été employés des enzymes à sérine, habituellement en combinaison avec des pénicillines plus susceptibles de l'hydrolyse de β-lactamases.

Des molécules ayant une structure de pénicilline, elles ont la propriété de se lier à certaines β-lactamases et de les inhiber de manière irréversible (Nauciel et Vildé, 2005; Maiti *et al.*, 2006).

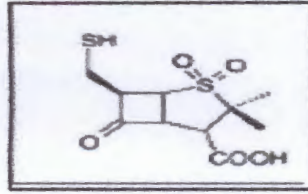


Figure 9. Structure chimique des β -inhibiteurs (Maiti *et al.*, 2006).

Le sulbactam et le tazobactam sont très proches et présentent une sulfonation en position 1 sur le noyau péname. Ils diffèrent essentiellement par une substitution de la chaîne latérale en position 2, le noyau clavame dérive du noyau péname par substitution du soufre en position 1 par un oxygène (Cavallo *et al.*, 2004).

- L'acide clavulanique, qui est un oxapénam, utilisé en association fixe avec l'amoxicilline et avec ticarcilline ;
- Les pénicillines-sulfones : sulbactam et tazobactam, obtenus par oxydation du soufre par deux atomes d'oxygène (Duval et Soussy, 1990).

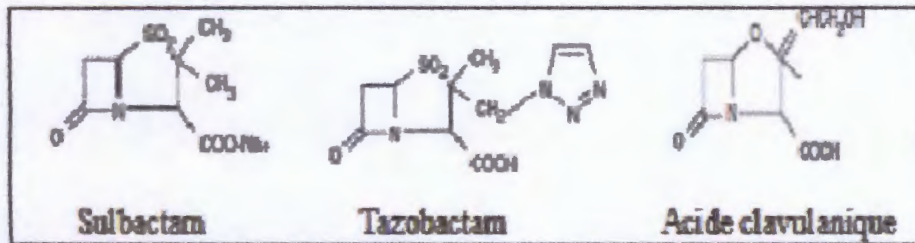


Figure 10. Structure chimique des inhibiteurs de β -lactamases (Cavallo *et al.*, 2004).

➤ Les céphèmes

• Céphalosporine

Les céphèmes correspondent aux céphalosporines au sens strict (figure 11). Certains céphèmes, les 7 α méthoxy céphalosporines, sont individualisés sous le nom de céphamycines. Les oxacéphèmes sont les 1 oxa 7 α méthoxy céphalosporines.

En dépit de ces différences de structure, ces divers produits sont souvent désignés globalement sous le terme de céphalosporines et classés, selon leurs propriétés antibactériennes, en trois générations (Duval et Soussy, 1990).



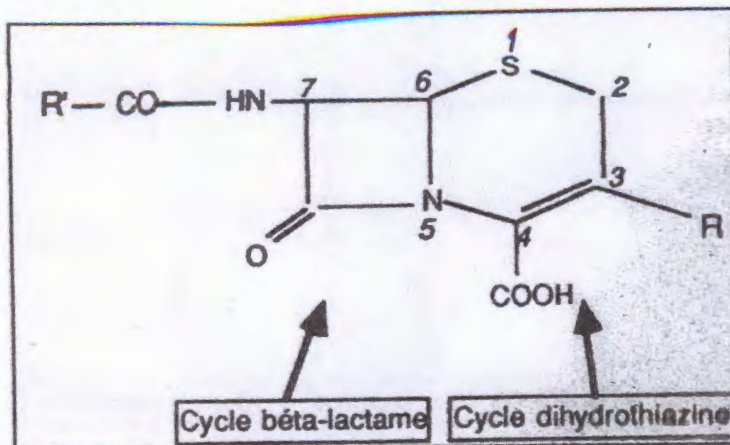


Figure 11. Structure des céphèmes (Duval et Soussy, 1990).

- ✦ Les céphalosporines de première génération (C1G) sont les suivants : céfalotine, céfazoline, céfapirine, céfradine, céfacétrile, céfalexine, céfadroxil, céfador, céfatrizine et céfaloridine (Duval et Soussy, 1990).
- ✦ Parmi les céphalosporines de deuxième génération (C2G), on peut citer : le céfamandole, céfuroxime, ainsi que deux molécules classées parmi les céphamycines : la céfoxitine et la céfotétan.
- ✦ Parmi les céphalosporines de troisième génération (C3G), on peut citer le céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone. Les dernières céphalosporines injectables de troisième génération commercialisées (céfépime, ceftiprome) et appelées par certains « de quatrième génération » (Cavallo *et al.*, 2004, Delglin et Vallerand, 2008).

• Monobactames

Le noyau des monobactames est limité au cycle β -lactame (Figure 12). Les premiers monobactames isolée de substances naturelles produites par certaines bactéries, mais les produits récents sont entièrement synthétiques. Le seul produit utilisé est l'aztréonam (Cavallo *et al.*, 2004).

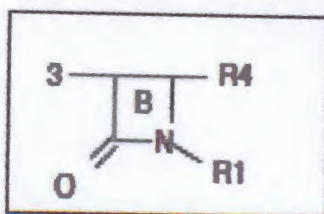


Figure 12. Structure des monobactames (Cavallo *et al.*, 2004).

• Carbapénèmes

Ils sont caractérisés par un noyau pénème et dérivent de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces cattleya*. L'atome de soufre du pentacycle pénème est remplacé par un atome de carbone pour donner un noyau pénème (figure 13). Cette introduction du carbone dans le noyau pentagonal, à l'origine du terme de carbapénème (Cavallo *et al.*, 2004).

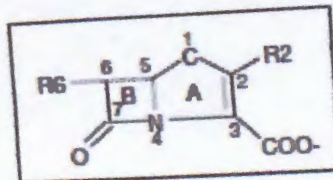


Figure 13. Structure de Carbapénème (Cavallo *et al.*, 2004).

Dans ce groupe le chef de file est l'imipénème. C'est un dérivé de la thiénamycine (Naucliel et Vildé, 2005).

II.2.1.2. Fosfomycine

La fosfomycine est un antibiotique naturel, produit par *Streptomyces fradiae*. Elle est très simple et sans aucune parenté avec les autres agents antimicrobiens ; il s'agit de l'acide L-cis 1-2 époxy propyl phosphonique et un antibiotique à large spectre (figure 14) (Duval et Soussy, 1990).

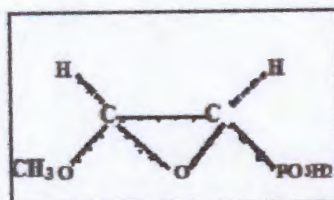


Figure 14. Structure chimique de fosfomycine (Duval et Soussy, 1990).

II.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

II.2.2.1. Antibiotiques de fixant sur la sous-unité 30S du ribosome

❖ **Aminosides (ou aminoglycosides) :** les aminosides ou aminoglycosides, plus correctement dénommés aminosides-aminocyclitols (AMAC), ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (Le Minor et Véron, 1989).

Le premier antibiotique de cette famille a été streptomycine, les molécules les plus employées sont la gentamicine, la netilmicine, la tobramycine et l'amikacine (Naucliel et Vildé, 2005).

❖ **Tétracyclines :** des antibiotiques du groupe de tétracycline sont activement transportés dans les cellules bactériennes et attachent à 30S. Les tétracyclines comprennent une série de composés qui possèdent en commun quatre cycles hexagonaux, d'où le nom de tétracycline donné à cette famille (figure 15). Selon la nature des radicaux greffés sur les différents cycles, on distingue : la chlortétracycline, la tétracycline, l'oxytétracycline, la diméthylchlortétracycline, la rolitétracycline, la doxycycline, la minocycline (Berche *et al.*, 1988 ; Roger *et al.*, 2003).

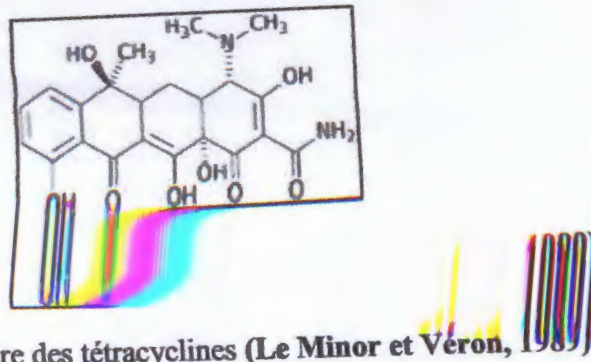


Figure 15. Structure des tétracyclines (Le Minor et Veron, 1989).

II.2.2.2. Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome

❖ **Chloramphénicol** : au départ, le chloramphénicol fut isolé à partir d'une culture de *Streptomyces venezuelae*. Sa molécule comporte un noyau nitrobenzène et deux atomes de chlore. La substitution d'un groupement nitré par une fonction méthylsulfonyl ($\text{CH}_3\text{-SO}_2$) donne le thiamphénicol (figure 16), son spectre d'action est similaire. Ces deux produits sont des antibiotiques bactériostatiques actifs sur la plupart des bactéries à Gram positif ou négatifs (Patrick, 2003).

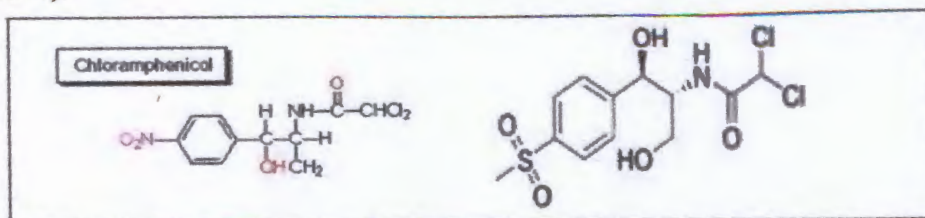


Figure 16. Structure du chloramphénicol et thiamphénicol (Patrick *et al.*, 2003).

❖ **La rifampicine** : *Streptomyces mediterranei*, produit plusieurs substances douées de propriété antibiotiques, parmi elles la rifampicine B et la rifampicine S qui par réduction devient la rifampicine SV (figure 17). Cette dernière est utilisée en thérapeutique et surtout son dérivé, la rifampicine. La rifampicine est un antituberculeux majeur, en dehors de cette action elle est active sur divers bacilles à gram négatif parmi lesquels certaines entérobactéries (Duval et Soussy, 1990).

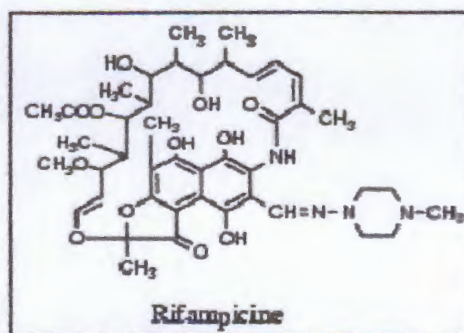


Figure 17. Structure de rifampicine (Le Minor et Véron, 1989).

II.2.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

❖ **Sulfamides et triméthoprime** : les sulfamides ont été les premiers agents antimicrobiens utilisés en thérapeutique anti-infectieuse. Leur structure est relativement simple et correspond à la formule générale indiquée sur (la figure 18) (Berche *et al.*, 1988).

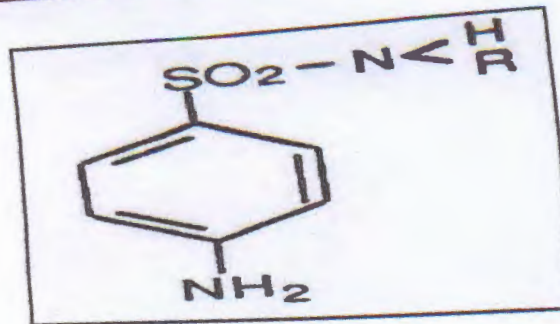


Figure 18. Structure des sulfamides (Berche *et al.*, 1988).

Le triméthoprime est une 2,4-diamino pyrimidine. L'association d'un sulfamide au triméthoprime est synergique pour un rapport donné d'un deux molécules. Cet effet peut être expliqué par un blocage de deux étapes d'une même voie métabolique (Berche *et al.*, 1988).

❖ **Quinolones** : l'histoire des quinolones a débuté il y a 40 ans avec l'introduction en thérapeutique de l'acide nalidixique qui est le chef de file, décrit en 1962 par Leshner *et al.* Celui-ci a été rejoint dans les années suivantes par les acides pipémidique, oxolinique et la fluméquine, qui a été la première fluoroquinolone (Soussy, 2004).

Tous ces antibiotiques, en raison de leur spectre étroit et de leurs propriétés pharmacocinétiques, sont essentiellement restés des médicaments des infections urinaires de l'adulte à entérobactéries sensibles. Les années 1980 ont vu la montée en puissance des fluoroquinolones proprement dites, parmi lesquelles des produits spécifiquement urinaires tels qu'énoxacine, loméfloxacin et norfloxacine, et des produits systémiques tels que ciprofloxacine, ofloxacine et péfloxacine, présentant une activité intrinsèque supérieure sur les entérobactéries, et actifs également sur les staphylocoques et dans une certaine mesure sur le bacille pyocyanique (Soussy, 2004).

Toutes les quinolones possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué et présentent une fonction cétone en 4 et un groupement carboxylique en 3. Ce cycle est accolé à un autre cycle aromatique variable : benzène, pyridine, pyrimidine (figure 19).

Les fluoroquinolones se caractérisent par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (figure 19) (Soussy, 2004).

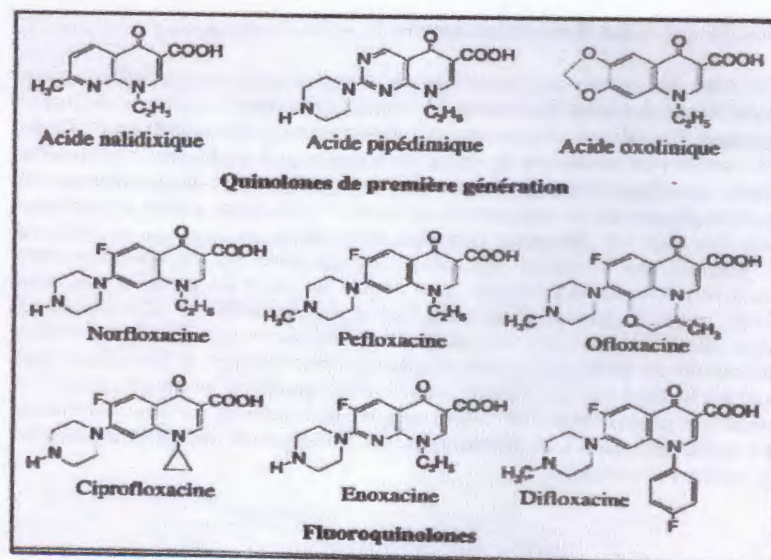


Figure 19. Structure des quinolones (Thierry, 1994).

II.2.4. Antibiotiques agissant sur les membranes

❖ **Polymyxines** : les polymyxines sont des polypeptides, en partie cyclisés. Ils sont formés de dix acides aminés dont la nature permet de distinguer différents composés actifs, découvertes simultanément en 1947 et sont produites par *Bacillus polymyxa*.

Cinq produits principaux constituent ce groupe : les polymyxines A, b, C, D, E. toutes sont toxiques en particulier pour le rein, à des degrés divers. Seules deux produits de cette série chimique, la polymyxine B et la colistine (ou polymyxine E), sont employés en thérapeutique (Berche *et al.*, 1988 ; Duval et Soussy, 1990).

II.3. Spectre d'activité mode d'action des antibiotiques

II.3.1. Spectre d'action des antibiotiques

Chaque antibiotique a un spectre d'activité. Ce dernier est résumé dans les tableaux suivants :

Tableau XII. Le spectre d'activité des différentes groupes d'antibiotiques de la famille de β -lactamines (Deboscker et Dubreuil, 2000 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Les β -lactamines	Spectre d'activité
Les pénicillines des groupes G et V	inactives sur les staphylocoques producteurs de pénicillinase et sur la plupart des bacilles à Gram négatif
Uréidopénicillines	Elles ont un spectre plus étendue que celui des aminopénicillines, sur les bacilles à Gram négatif, englobant en particulier <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , ou des entérobactéries comme les <i>Proteus</i> indole positif, <i>Serratia</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp, ou <i>Citrobacter freundii</i> , elles restent sensibles aux pénicillinases, mais sont moins sensibles aux céphalosporinases
Amidinopénicillines	Ce produit est actif sur certaines entérobactéries et n'est utilisé que dans les infections urinaires
Monobactames: l'aztréonam	Son activité sur les bacilles à Gram négatif est comparable à celle des céphalosporines de C3G, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies

✓ **Les C1G** : sont des agents efficaces contre de nombreux cocci à Gram positif ; aucun effet sur les microorganismes suivant : staphylocoque résistant à la méticilline, *bacteroides fragilis*, entérocoques, effet limité contre certains bacilles à Gram négatif, incluant : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* (Delglin et Vallerand, 2008).

Le spectre d'action des C2G est similaire à celui des C1G mais l'effet contre plusieurs autres agent pathogènes à Gram négatif est accru, le spectre d'action englobant les microorganismes suivants : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Moraxella catarrhalis*, aucun effet contre les staphylocoques résistant à la méticilline ou les entérocoques. Les C3G ont un effet similaire à celui des C2G (Delgin et Vallerand, 2008).

✓ L'imipénème est très actif sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. Des résistances acquises sont apparues chez *P. aeruginosa*. De très rares souches d'entérobactéries et d'*Acinetobacter* capables de dégrader l'imipénème ont été décrites (Nauciel et Vildé, 2005).

✓ Les Aminosides sont des antibiotiques à spectre large, habituellement bactéricide sur les coques à Gram positif et négatif, bacilles à Gram positif et les bacilles à Gram négatif (entérobactéries) (Le Minor et Véron, 1989).

✓ Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques actifs sur les bactéries à Gram négatif ou positif. Le spectre d'activité de ces différents produits est identique, à l'exception de la minocycline qui peut être active sur certaines souches résistantes aux tétracyclines (Berche *et al.*, 1988 ; Roger *et al.*, 2003).

✓ Les polymyxines sont des antibiotiques bactéricides, actifs uniquement sur les bacilles à Gram négatifs aérobies, exception faite des *Proteus* et *Serratia* (Duval et Soussy, 1990).

II.3.2. Le mode d'action des antibiotiques

II.3.2.1. Le mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Elles présentent une analogie structurale avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Berche *et al.*, 1988 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Les β -lactamines se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées **protéines de liaison des pénicillines (PLP)**. Ce sont les cibles des β -lactamines. Ces PLP sont les enzymes impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes : les transpeptidase, les carboxypeptidases et les transglycosylases le dipeptide de D-Ala-D-Ala est le substrat naturel de ces enzymes. La nature de ces PLP est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à l'autre (Le Minor et Véron, 1989).

Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent, avant de diffuser dans le peptidoglycane, diffuser dans la membrane externe hydrophobe. Le passage à travers cette barrière des β -lactamines, se fait par l'intermédiaire de véritables canaux protéiques, les porines. Les β -lactamines vont diffuser au travers des porines présentes dans la membrane externe puis traverser le peptidoglycane et l'espace périplasmique pour aller se fixer sur les PLP (figure 20) (Berche *et al.*, 1988).

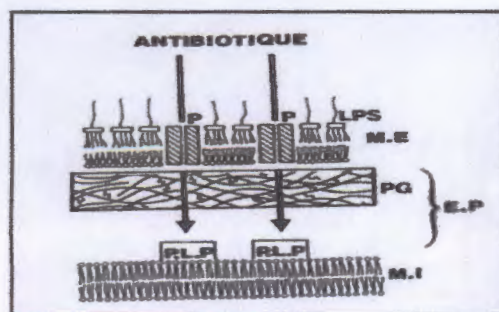


Figure 20. Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif

PG : peptidoglycane ; MC : membrane cytoplasmique ; CT : cytoplasme ; ME : membrane externe ; EP : espace périplasmique ; P : porines (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.3.2.2. Mode d'action des fosfomycines sur les bactéries

La fosfomycine inhibe l'une des premières étapes de la synthèse de la paroi en se fixant sur la phosphoénol pyruvate à l'UDP-N-acétyl glucosamine. Cette fixation empêche la formation d'UDP-acide-N-acétyl muramique, constituant fondamental du peptidoglycane (Berche *et al.*, 1988).

II.3.2.3. Mode d'action des aminosides

Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau du ribosome. Le franchissement de la membrane externe des bactéries à Gram négatif se fait à travers les porines. Après pénétration à l'intérieur de la cellule bactérienne et fixation au niveau de la sous unité 30S ; la streptomycine empêche la fixation des facteurs d'initiation, provoque des erreurs de lecture de l'ARN-messager et des anomalies de la translocation (Duval et Soussy, 1990).

II.3.2.4. Mode d'action des tétracyclines

Une diffusion passive à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif soit par les pores, soit à travers la couche lipidique, puis le passage au travers du peptidoglycane (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les tétracyclines sont des molécules qui ont une propriété de la possibilité de former des complexes avec de nombreux ions, dont les ions Mg^{+2} . Ces derniers, expliqueraient le passage à travers la membrane des tétracyclines et leur accumulation intra cytoplasmique, où se fixent de façon irréversible sur la sous-unité 30S du ribosome, empêchant la fixation de nouveaux aminoacyl-ARNt. La synthèse protéique et donc interrompue (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.3.2.5. Mode d'action du chloramphénicol

Les phénicoles bloquent la synthèse protéique des bactéries après s'être fixés sur certaines protéines de la sous-unité 50S. Ils interagissent d'une part avec le site « aminocyl » (site A sur lequel se fixe la molécule d'ARN associée à un acide aminé) et, d'autre part, ils inhibent l'action de la peptidyltransférase, qui catalyse la formation de la liaison peptidique (Berche *et al.*, 1988).

II.3.2.6. Mode d'action de la rifampicine

Cette molécule est très hydrophobe passe mal la membrane externe des bacilles à Gram négatif, c'est ce qui explique sa faible activité sur ces bactéries. La molécule inhibe la synthèse

Protéique à une étape très précoce, il s'agit d'une inhibition de la transcription de l'ADN en ARN. La rifampicine se fixe sur une sous-unité de l'ARN polymérase et bloque son action (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.3.2.7. Mode d'action des sulfamides et des triméthoprimes

Les sulfalides et le triméthoprime sont des antimétabolites qui entrent en compétition avec les substrats naturels dans la synthèse des flotes. Les flotes sont des substrats carbonés utilisés par la bactérie dans la synthèse de ses acides nucléiques (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les sulfalides et le triméthoprime sont les analogues structuraux de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) et du dihydrofolate (DHF), respectivement. A ce titre, ce sont des inhibiteurs compétitifs des deux enzymes dihydroptéroate synthétase (DHPS) et dihydrofolate réductase (DHFR). La fabrication des acides nucléiques engagés dans la synthèse de l'ADN est diminuée, ce qui ralentit la croissance bactérienne (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.3.2.8. Mode d'action des quinolones

L'action antibiotique de ces produits est due à une inhibition de la réplication de l'ADN bactérien par blocage de l'ADN gyrase (Berche *et al.*, 1988).

II.3.2.9. Mode d'action des polymyxines

Les molécules de polymyxine sont des composés cationiques et leur action a été rapprochée de celle des détergents cationiques. Elles se fixent sur les membranes bactériennes (en particulier la membrane externe des bactéries à Gram négatif), qu'elles altèrent, provoquant ainsi des troubles de perméabilité. Les polymyxines se combinent aux phospholipides de la membrane ce qui aboutit à une désorientation des couches de la membrane. L'équilibre osmotique de la cellule est rompu, des constituants du contenu cellulaire sont libérés, ce qui conduit à la mort de la bactérie (Duval et Soussy, 1990).

II.4. La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

L'apparition de résistance suite à l'utilisation d'une molécule antimicrobienne a été observée depuis longtemps chez les cellules eucaryotes puisque vers 1902-1904 une étude sur les souris infectées par des trypanosomes, traitées par des colorants des dérivés tryphénileméthanes, a permis de montrer l'émergence de souches résistantes à ces divers agents (Thierry, 1994).

Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons. . .). Les caractéristiques et les propriétés des mutations les différents mécanismes de la résistance sont décrits (Kempf et Zeitouni, 2009).

II.4.1. Origines des résistances

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (Carle, 2009).

❖ La résistance naturelle

La résistance naturelle est une caractéristique d'une espèce bactérienne, de support habituellement chromosomique qui délimite le spectre des antibiotiques et peut aider à l'identification. La transmission de cette résistance est verticale, de la bactérie vers sa descendance (Moïty *et al.*, 2001).

❖ La résistance acquise

La résistance acquise de support chromosomique ou plasmique, fait suite à une mutation ou une acquisition de gènes conférant la résistance. Cette résistance est transmissible à la descendance (verticale) ou à d'autres bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes (transmission horizontale) (Moïty *et al.*, 2001).

Les mécanismes génétiques de la résistance sont de deux types : modifications de l'ADN chromosomique par mutation et transfère d'ADN chromosomique ou non, c'est deux mécanismes qui peuvent survenir simultanément ou successivement (Philippon, 2008).

❖ Résistance chromosomique

C'est une résistance liée au chromosome il s'agit ainsi de l'expliquer le déterminisme de la génétique d'une résistance naturelle ou acquise dont le ou les gènes et ou sont liés au chromosome (Philippon, 2008).

La résistance est généralement due à une mutation au niveau de l'ADN qui affecte spécifiquement le mécanisme d'action d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques (Guillot, 1989).

❖ Résistance extra-chromosomique

La résistance est liée à l'acquisition d'un fragment d'ADN porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance, le synonyme de cette résistance est donc acquise, et plasmidique. Le support génétique de cette résistance est un ADN additionnel d'un ou plusieurs gènes de la résistance (Philippon, 2008).

❖ Transposable

Un gène de résistance localisé (s) sur un ADN «mobile» ayant une organisation particulière. Les transposons responsables d'antibiorésistance correspondent à un segment d'ADN long de 700 à quelques milliers de paires de base et constitué d'un ou plusieurs gènes de résistance limités aux extrémités par des séquences répétitives inversées pouvant ou non faire partie de séquences d'insertion. Le transposon peut transposer d'un plasmide à un chromosome ou vice versa (Guillot, 1989 ; Philippon, 2008).

II.4.2. La multi-résistance

Les bactéries sont dites multi résistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont

alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (Carle, 2009).

II.4.3. Mécanismes biochimiques de résistance

Les bacilles à Gram négatifs sont devenus de plus en plus résistants aux antibiotiques, chez des entérobactéries, elle provient de différents mécanismes ; Certaines espèces ont une résistance naturelle ; Certaines sont chromosomiques et entraînent par exemple des modifications ribosomales ou de perméabilité. Mais ce sont surtout les phénomènes de résistance acquise par plasmide qui ont pris une importance considérable. En vérité toutes les entérobactéries sont susceptibles d'acquérir des plasmides et par conséquent de devenir résistantes à un ou plusieurs antibiotiques de façon plus ou moins épidémique (Le Minor et Véron, 1989).

Les mécanismes de résistance sont classés en 4 groupes : l'inactivation de l'antibiotique, la modification de la cible, la diminution de la perméabilité membranaire et phénomène d'efflux (Nauciel et Vildé, 2005).

II.4.3.1. L'inactivation de l'antibiotique par modifications enzymatique

Pour être actif, l'antibiotique doit arriver intact à sa cible. Lorsqu'il ya modification de l'antibiotique par des enzymes présents dans la bactérie à quelque niveau que ce soit, la forme modifiée de la molécule antibiotique est le plus souvent inactive. Ces enzymes se rencontrent de façon naturelle ou acquise chez les bactéries d'intérêt clinique (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.4.3.2. Modification de la cible

Après la pénétration cellulaire de l'antibiotique, il existe une étape de reconnaissance de la cible, c'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance. Il s'agit :

- soit d'une résistance naturelle avec la mauvaise affinité de certains antibiotiques pour les cibles ;
- soit d'une résistance acquise avec modification des cibles et perte d'affinité des antibiotiques pour ces cibles (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Un exemple sur la modification des PLP (cas de β -lactame) :

Dans le cas des β -lactamines, les cibles bactériennes sont appelés PBP (penicillin-binding proteins). La modification de ce dernier peut avoir comme conséquence une affinité diminuée pour ces antibiotiques. Dans certains cas, une mutation du PBP normal, rend l'antibiotique incapable de se lier sur sa cible (Maiti *et al.*, 2006).

II.4.3.3. Phénomènes d'imperméabilité

Il faut, pour qu'un antibiotique soit actif, qu'il pénètre jusqu'à sa cible. Cela suppose qu'il soit capable de traverser les divers couches de la paroi bactérienne : la membrane externe ; l'espace périplasmique ; le peptidoglycane ; et la membrane cytoplasmique. Les antibiotiques qui agissent sur les bactéries à Gram négatif doivent au moins franchir cette barrière (Gaudy et Buxeraud, 2005).

Les porines sont des protéines formant des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles représentant la

majorité des antibiotiques. Des mutations peuvent entraîner l'imperméabilité à plusieurs familles d'antibiotiques simultanément (Nauciel et Vildé, 2005).

II.4.3.4. Phénomène d'efflux

La résistance par système d'efflux, découverte plus récemment, apparaît être le principal mécanisme chez les bactéries à Gram négatif et divers gènes codent pour les protéines membranaires permettant l'efflux de l'antibiotique hors de la cellule et donc empêchant son accumulation intracellulaire. Ces protéines de l'ordre de 40-46 kDa montrent des homologies structurales entre elles ainsi qu'avec d'autres protéines des efflux. Les gènes chromosomiques codant des protéines membranaires de transport peuvent être responsables de la résistance à divers antibiotiques (Philippon, 2008).

Il existe cinq familles des pompes d'efflux (figure 21) :

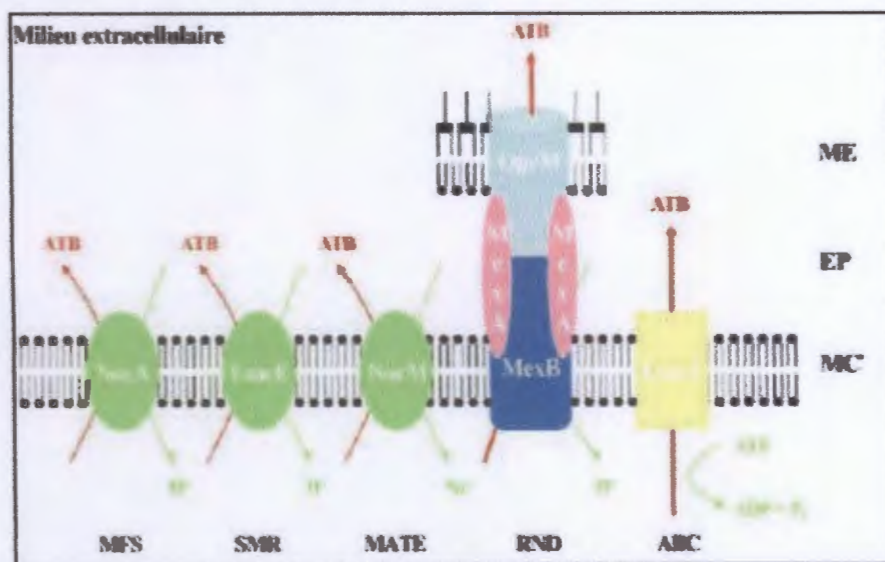


Figure 21. Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux (Cattoir, 2004)

MFS: major facilitator superfamily; **SMR**: small multidrug resistance (ex. EmrE chez *Escherichia coli*); **MATE**: multidrug and toxic compound extrusion; **RND**: resistance-nodulation cell division avec MexA (membrane fusion protein) et OprM (outer membrane factor); **ABC**: ATP-binding cassette. ME, EP : membrane externe et espace périplasmique des bactéries à Gram négatif ; MC : membrane cytoplasmique ; ATB : antibiotique substrat (Cattoir, 2004).

Chez *Escherichia coli*, différents systèmes d'efflux contenant des pompes RND ont été décrits. Le système *multipl antibiotic resistance* (*mar*) est un système qui augmente la résistance à de nombreux antibiotiques dont les β -lactamines. Constitué de plusieurs gènes tels que *marA*, *marB*, *marPAR*, *marC*, etc. *marA* code un activateur transcriptionnel qui agit au niveau de plusieurs promoteurs, et dont la synthèse est réprimée en l'absence d'antibiotique par un répresseur produit du gène *marRAB*. La surexpression de MarA entraîne la surexpression de la pompe à efflux Acr AB et la résistance à divers antibiotiques. Des mutants homologues au système Acr AB ont été décrits chez d'autres entérobactéries qu'*E. coli* (Philippon, 2008).

II.5. Mécanismes de résistance des différents antibiotiques chez les Entérobactéries

II.5.1. La résistance bactérienne aux β -lactamine

Les mécanismes de résistance acquis aux β -lactamines sont de nature enzymatique (Cavallo *et al.*, 2004). Le principal mécanisme de ces résistances est constitué de β -lactamases. Ces enzymes sont classées selon deux arrangements généraux : la classification d'Ambler et la classification de Bush-Jacobi-Medeiros.

L'arrangement d'Amber divise les β -lactamases en 4 groupes principaux : Classes A ; Classes C (AmpC) ; Classes D (sont des enzymes à sérine active) ; Classes B : c'est la seule classe regroupant les métallo- β -lactamases (MBL), nécessitant les ions Zn^{++} pour leur activité (Paterson et Bonomo, 2005; Philippon et Arlet, 2006).

En 1995, Bush-Jacobi-Medeirosa présentait la dernière classification des lactamases en quatre groupes principaux et sous-groupes comme suit:

- ☞ Le groupe 1 correspond à des céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique ;
- ☞ Le groupe 2 est composé de pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases, et carbapénémases, inhibées par l'acide clavulanique. Ils ont été divisés en deux sous-classes : 2a et 2b (sous-groupes : 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, et le sous-groupe 2f) ;
- ☞ Le groupe 3 : correspond à des métallo-enzymes ;
- ☞ Le groupe 4 : qui contient des enzymes non inhibés par l'acide clavulanique (Kfoury *et al.*, 2003).

Les β -lactamases sont retenues dans l'espace périplasmique et coupent la liaison amide dans le noyau β -lactame, agissant par l'intermédiaire d'un ester de sérine ou d'un mécanisme dépendant de l'ion zinc, ceci aboutit à un cycle β -lactame ouvert (Muller et Frepc, 2004).

II.5.2. La résistance bactérienne aux fosfomycines

Le mécanisme de résistance acquise correspond :

- ☞ Soit à une diminution du passage intracytoplasmique de la fosfomycine A une altération des systèmes de transport ;
- ☞ Soit à une modification de l'affinité de la pyruvyl-transférase pour la fosfomycine (Bustany et chaument-Riffaud, 1993).

II.5.3. Résistance bactérienne aux aminosides

La résistance bactérienne aux aminosides s'articule autour de trois mécanismes :

II.5.3.1. Défaut de pénétration de l'antibiotique

La pénétration des aminosides qui sont des poly-cations dans les bactéries est un phénomène de diffusion passive au travers les porines de la membrane externe et de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne. Diverses espèces de *Serratia* peuvent résister de façon croisée aux aminosides et aux β -lactamines à la suite de l'altération des porines *ompF*. Toutefois une résistance acquise à la suite d'une mutation portant sur les systèmes de transport d'électrons est aussi possible ; c'est le cas de *E. coli* (Le Minor et Véron, 1989 ; Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.5.3.2. Modification de la cible ribosomale

Une mutation du gène codant pour l'ARN ribosomol 16S confère une résistance importante et non croisée. Elle est à l'origine de la résistance des germes vis-à-vis de la streptomycine (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.5.3.3. Inactivation de l'antibiotique

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontré en clinique. Trois familles d'enzyme sont impliquées : des acétyltransférases (AAC), des nucléotidyltransférases (ANT) et des phosphotransférases (APH), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (acétylation d'un groupement aminé, adénylylation d'un groupement hydroxyle ou phosphorylation). Les gènes codant pour ces enzymes sont naturellement présents sur le chromosome bactérien (Gaudy et Buxeraud, 2005).

La connaissance des mécanismes d'inactivation enzymatiques, et plus particulièrement celle des fonctions de l'aminoside concernée, a permis d'obtenir des antibiotiques actifs sur les souches devenues résistantes. Ces dérivés d'hémisynthèse se différencient de la molécule mère soit par la suppression du site d'inactivation, soit par le greffage sur la fonction menacée d'un groupe protecteur qui, par effet stérique, défavorise l'approche de l'enzyme. Ces modifications structurales empêchent l'antibiotique modifié d'être substrat des enzymes inactivantes (Gaudy et Buxeraud, 2005).

II.5.4. La résistance bactérienne aux tétracyclines

Un certain nombre de germes sont spontanément résistants (origine chromosomique), mais l'apparition diffuse de souches insensibles est notamment chez *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*. Cette résistance est d'origine plasmidique, plus rarement chromosomique. Elle est due à une excrétion transmembranaire active (efflux) de la cycline après sa pénétration dans la cellule bactérienne, contrôlée par des protéines particulières, les TET-protéines, dont les déterminants sont transmis par des plasmides (Brion *et al.*, 1992).

II.5.5. La résistance bactérienne aux chloramphénicol

Les entérobactéries deviennent généralement résistantes au chloramphénicol en acquérant des plasmides de résistance qui codent la production du chloramphénicol acétyl-transférase (C.A.T). Cette enzyme provoque l'acétylation des groupements alcooliques ; il y a formation du produit diacétylé. Cette modification rend l'antibiotique incapable de se fixer sur le site récepteur de la sous-unité 50S du ribosome de la bactérie. Un type de résistance a été observé avec le chloramphénicol ; il s'agit d'une résistance par imperméabilité à l'antibiotique au niveau de la membrane cytoplasmique. Chez *E. coli*, certains mutants ne permettaient plus la pénétration alors que les systèmes endocellulaires ribosomiaux demeuraient sensibles à l'antibiotique (Brion *et al.*, 1992).

II.5.6. Mécanisme de résistance la rifampicine des bactéries

La résistance des bactéries aux rifamycines est due essentiellement à une modification de la cible, c'est-à-dire de l'ARN polymérase, par mutations chromosomiques. Une fréquence de mutation est assez élevée, notamment avec les cocci à Gram positif, et les rifamycines doivent donc toujours être données en association avec d'autres antibiotiques (Berche *et al.*, 1988).

II.5.7. Résistance bactérienne aux sulfamides et triméthoprimes

La sulfamides et triméthoprimes bloque les étapes de synthèse des folates en inhibent soit la dihydrofolate réductase (triméthoprime) soit la dihydroptéroate synthétase. Les bactéries peuvent résister à cette action par trois mécanismes :

- en augmentant la quantité de précurseur (l'acide para aminobenzoïque) ;
- en augmentent la synthèse de ces enzymes (surproduction de dihydrofolate réductase normale à codage chromosomique) (Vaubourdolle, 2007).

II.5.8. Résistance bactérienne aux quinolones

Les niveaux de résistance aux quinolones et fluoroquinolones ont évolué pour atteindre en France en 2003 de l'ordre de 12 à 15 % des souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones et près 10% des souches résistantes aux fluoroquinolones (Nordmann, 2005).

Les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications ponctuelles des cibles, les topo-isomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (Nordmann, 2005).

En 1998, un nouveau mécanisme de résistance aux quinolones fut décrit dans une souche nord-américaine de *K. pneumoniae*. Il s'agissait d'un mécanisme de résistance jusque-là inconnu dit « Qnr » (*Quinolone Resistance*). Ce déterminant de résistance est une protéine qui s'intercale entre les topo-isomérases de type II (gyrase) et les quinolones et fluoroquinolones bloquant ainsi tout ou partie de leur activité antibiotique (Nordmann, 2005).

Ce mécanisme de résistance fut trouvé dans de nombreuses autres souches nord-américaines quelques souches d'*E. coli* de Chine une souche de *Providencia stuartii* d'Égypte et très récemment dans des souches d'*E. coli* de Corée du Sud (Nordmann, 2005).

II.5.9. Résistance bactérienne des polymyxines

Un certain nombre de germes sont spontanément résistants (origine chromosomique), mais l'apparition diffuse de souches insensibles est notamment chez *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*. Cette résistance est d'origine plasmidique, plus rarement chromosomique. Elle est due à une excréation transmembranaire active (efflux) de la cycline après sa pénétration dans la cellule bactérienne, contrôlée par des protéines particulières, les TET- protéines, dont les déterminants sont transmis par des plasmides (Brion *et al.*, 1992).

Chapitre III :
Les méthodes utilisées
pour l'étude de la
résistance
bactériennes aux
antibiotiques chez les
entérobactéries

La détermination *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est indispensable pour guider l'antibiothérapie. Elle permet d'adapter au mieux la prescription de l'antibiotique et par connaissance des sensibilités locales (hôpital), aide à la prescription empirique de l'antibiotique. D'un point de vue épidémiologique, elle permet de suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques sur le plan local (Lausanne et Zürich, 2013).

Les résistances naturelles ne posent pas de problème au médecin car elles sont définies et bien connues. En revanche, le développement de résistances acquises des bactéries pose un problème en raison du principe d'incertitude qu'elles introduisent dans l'efficacité de la prescription empirique d'un antibiotique et de l'impasse thérapeutique qui peut en résulter (Gennéa et Siegrist, 2003).

En pratique courant, la sensibilité aux antibiotiques est étudiée par des techniques automatisées ou par des méthodes de diffusion en milieu solide comme l'antibiogramme. Sous le terme de ce dernier, sont regroupées toutes les méthodes qui, en évaluant *in vitro* l'activité des antibiotiques sur une souche bactérienne responsable d'infections (Weber, 2003 ; Huet, 2007).

Il s'agit de quelques techniques rapides de détection des mécanismes de résistance disponibles dans les laboratoires et s'avèrent très utiles. Elles sont des techniques microbiologiques, biochimiques, et de biologie moléculaire introduites dans les laboratoires de microbiologie (Leclercq, 2004).

III.1. Méthodes microbiologiques

III.1.1. Antibiogramme

III.1.1.1. Définition de l'antibiogramme

L'antibiogramme s'est développé à partir des années 1950 en raison de l'apparition et de la diffusion de la résistance bactérienne.

L'antibiogramme est un examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient (Scavizzi et al., 2000). Il a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques (Houssni, 2011).

III.1.1.2. Les comités d'antibiogramme

À la fin des années 70, des comités d'antibiogramme se sont créés dans différents pays pour la standardisation de l'antibiogramme suite aux recommandations de l'OMS en 1977.

Ce sont NCCLS (USA), CA-SFM (France), BSAC (UK), DIN (Allemagne), CRG (Pays Bas), SRGA (Suède), NWGA (Norvège), Mensura (Espagne) (Marcel, 2005).

Sous la direction de la Société européenne de microbiologie clinique et maladies infectieuses (ESCMID), un comité d'experts a développé et travaillé à l'harmonisation d'une méthodologie unique pour tester la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. Ce comité (EUCAST pour European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Lausanne et Zürich, 2013).

En Suisse, depuis de nombreuses années, l'interprétation des tests S/ R/ I (sensible/résistante/intermédiaire ou indéterminé) se basait sur des concentrations critiques (break points) établies par un comité américain NCCLS (Organisme Indépendant et Autofinancé), qui a changé de nom devenu aujourd'hui CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) (Lausanne et Zürich, 2013).

En 1985, plusieurs auteurs ont utilisé des méthodes d'analyse des données pour séparer des phénotypes de S (sensible)/R (résistance) au sein d'une population bactérienne. Une procédure utilisant ces méthodes d'analyse et confrontant leurs résultats aux données pharmacologiques, a été publiée en 1987 et 1988 avec ses applications possibles, notamment l'interprétation de l'antibiogramme (Lausanne et Zürich, 2013).

III.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible de la souche bactérienne étudiée exprimé par mg/l ou µg/ml. Une mesure précise de la CMI n'est que trop rarement réalisée. En routine, l'essentiel des résultats sont rendus selon la catégorisation S, I ou R (sensibilité, intermédiaire, résistance) (Huet, 2007 ; Caron, 2012).

L'antibiogramme a été bien standardisée et existe en trois versions :

- ☞ Méthodes de diffusion en milieu solide;
- ☞ Méthodes de dilution en milieu liquide; ou solide ;
- ☞ L'antibiogramme automatisé (Marcel, 2005).

Les méthodes de dilution ne sont pas réalisées en pratique courante surtout les souches isolées au laboratoire, plusieurs antibiotiques devant être testés. C'est la méthode de diffusion en gélose qui est couramment utilisée, son principe étant la détermination indirecte de la CMI (Huet, 2007).

III.1.2.1. Méthodes de diffusion en milieu solide

Des disques de papier buvard imprégné d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencée avec le germe à étudier. A partir de disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, y créant un gradient de concentration. Après l'incubation (18-24h à 37°C) chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la bactérie :

la culture s'arrête où la concentration d'antibiotique est égale à la CMI de la souche bactérienne étudiée (Huet, 2007).

Pour lire les résultats, il suffit de mesurer les diamètres des zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne.

Pour chaque souche microbienne, la sensibilité ou la résistance à un antibiotique est différente. Elle fait appel aux notions de concentration critique inférieure (c : dose minimale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans danger et qui fait effet sur la souche bactérienne) et de concentration critique supérieure (C : dose maximale d'antibiotique qu'un malade peut recevoir sans danger et qui fait effet sur la souche bactérienne) (Houssni, 2011).

- la bactérie est sensible (S) à l'antibiotique quand la CMI est inférieure à la concentration critique inférieure $CMI \leq c$ (diamètre $\geq d$) ;
- la bactérie est résistante (R) à l'antibiotique quand la CMI est supérieure à la concentration critique supérieure $CMI \geq C$ (diamètre $\leq d$) ;
- la bactérie est intermédiaire (I) à l'antibiotique quand la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques $c \leq CMI \leq C$ ($d \leq \text{diamètre} \leq D$) (Houssni, 2011).

L'antibiogramme est une méthode simple, facile et reproductible mais sensible à certains facteurs :

- Milieu de culture : standardisé : Mueller-Hinton, épaisseur (4mm), pour les bactéries à croissance rapide sur milieux usuels ;
- Inoculum bactérien : standardisé : $2-3 \cdot 10^6$ bactéries par ml ;
- Conservation des disques (+4°C) (Huet, 2007).

III.1.2.2. Méthode de dilution

↳ Dilution en milieu solide (méthode de dilution en gélose)

C'est la méthode de référence en France CA-SFM (comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie). Elle consiste à incorporer des quantités croissantes de l'antibiotique dans la gélose coulées en boîte de Pétri, en réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2. Les souches bactériennes sont ensemencées en strie ou en spot (en « tache ») à l'aide d'un ensementeur multiple de type steers (inoculum de 10^4 bactéries par spot) la lecture se fait à 18 et 24 heures (Huet, 2007).

↳ Dilution en milieu liquide

C'est la méthode de référence de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), à côté de la méthode de dilution en gélose. La gamme de concentration d'antibiotique est réalisée en bouillon nutritive ensemencé avec la souche à tester. La CMI correspond au tube dans lequel il n'y a pas de croissance visible. Cette méthode peut être automatisée en utilisant des plaques de microtitration (microdilution en milieu liquide). La méthode de dilution fournit une bonne appréciation de l'activité d'un produit, mais elle est relativement imprécise (Huet, 2007).

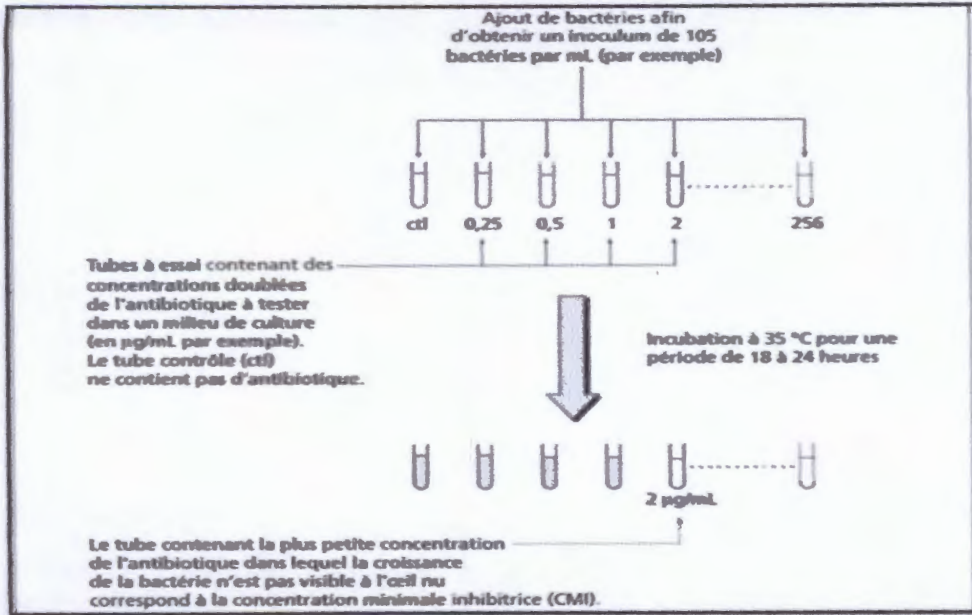


Figure 22. Méthode de dilution en milieu liquide (Woods, 1995).

L'E-test

Cette technique introduite dans les années 1990 s'est révélée rapidement très utile en pratique de routine de laboratoire. Techniquement, l'antibiotique est contenu dans un espace limité à une extrémité de la bandelette. Lorsque celle-ci est déposée sur une gélose Müller-Hinton (milieu spécifique pour la mesure de l'activité des antibiotiques), préalablementensemencée à l'aide d'un inoculum bactérien contenant 10^6 UFC/ml, l'antibiotique se répartit selon un gradient de concentration très précis. La lecture est réalisée après 24 ou 48 heures d'incubation à 37 °C. Une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette. Cette technique a largement amélioré la prise en charge des CMI en comparaison de la technique de référence (dilution en milieu liquide ou solide), fastidieuse et lente (Guillou, 2006).



Figure 23. Méthode d'E-test (Gennéa et Siegrist, 2003).

La technique E-test est plus souvent réservée à la prescription clinique de la CMI pour un patient donné, alors que la technique de référence sera réservée aux études de population bactérienne lors de l'évaluation de la sensibilité d'un antibiotique (Guillou, 2006). L'E-test est rapide, facile à réaliser, utile pour guider l'antibiothérapie en déterminant la sensibilité des

germes aux antibiotiques, détectant les mécanismes de résistance, les synergies ou les antagonismes entre deux antibiotiques (Guillou, 2006).

III.1.2.3. Antibiogramme automatique

Le principe de la méthode est celui des dilutions en milieu liquide. Les concentrations d'antibiotiques figurant dans le système sont exclusivement les concentrations critiques, par rapport auxquelles les souches seront définies en sensibles, intermédiaires ou résistantes (Bergogne-Berezin *et al.*, 1977).

Le dispositif utilisé est une couronne à usage unique comprenant :

- ✓ Une cuvette centrale destinée à recevoir la suspension bactérienne ;
- ✓ Trente-six cupules identiques, à parois transparentes, réparties à la périphérie du dispositif et reliées à la cuvette centrale par 36 conduites capillaires pourvues d'un étranglement (Bergogne-Berezin *et al.*, 1977).

Les antibiotiques, préalablement, distribués et lyophilisés dans les cupules à raison de 2 concentrations (valeurs critiques) par antibiotique. Le milieu de culture Mueller-Hinton est également lyophilisé dans les cupules. La répartition de l'inoculum est réalisée automatiquement à l'aide d'une brève centrifugation qui permet le remplissage des cupules par un volume égal à 100 μ l du liquide ensemencé.

Le système permet de tester simultanément la sensibilité d'une souche à 16 antibiotiques, appartenant à 7 familles: β lactamines, aminosides, cyclines, chloramphénicol, polypeptides, quinolones, triméthoprime-sulfam 6 thoxazole (Bergogne-Berezin *et al.*, 1977).

La lecture, après 16 h à 18 heures d'incubation est faite par une machine de lecture qui interprète la densité optique liée à la croissance bactérienne (par rapport à des témoins positifs et négatifs), et qui inscrit automatiquement la sensibilité de la bactérie (S, I ou R) sur un feuillet de résultats (Bergogne-Berezin *et al.*, 1977).

☞ Systèmes de lecture automatique des antibiogrammes en diffusion

En raison de l'importance du nombre d'antibiogrammes journaliers et du nombre d'antibiotiques testés en routine, jusqu'à atteindre pour certains services hospitaliers 32 antibiotiques pour les entérobactéries, l'automatisation de la lecture pouvait être d'un grand secours (Bernier *et al.*, 2001).

La mise au point, au cours des années 1990, de systèmes couplant une caméra à un logiciel d'analyse de l'image, a ainsi permis d'automatiser les tâches de lecture de l'antibiogramme par diffusion, de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre, d'être plus rapide et de gagner en reproductibilité. Une connexion est aussi possible avec les automates en milieu liquide (Phoenix[®], Vitek2[®]). Enfin, l'automatisation a été encore plus poussée avec l'apport de « tourelles » ou d'incubateurs permettant d'incuber 48 boîtes (Bernier *et al.*, 2001).

III.1.3. Tests complémentaires utilisés pour l'étude de la résistance aux antibiotiques

III.1.3.1. Test synergie pour la détection de BLSE

Différents tests phénotypiques sont recommandés par le CA-SFM pour la détection des souches productrices de BLSE. Ils reposent sur la mise en évidence d'une synergie entre le clavulanate et des C3/4G, le céfotaxime, la ceftazidime et le céfépime (figure 24).

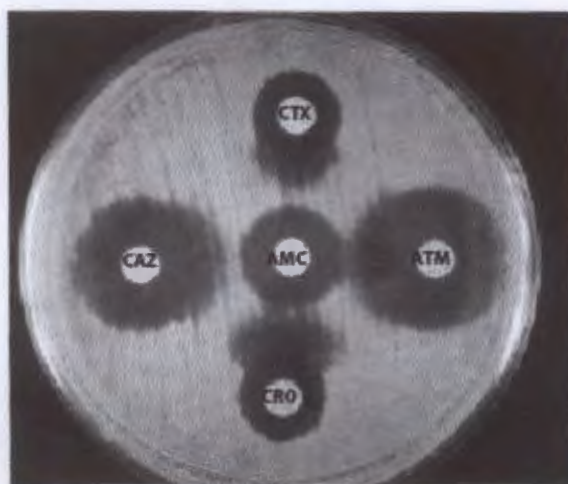


Figure 24. Souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de β -lactamase à spectre élargi (bouchon de champagne) (Ouar- Korichi, 2011).

Le test de synergie traditionnel avec des distances inter-disques pouvant varier entre 2 et 4 cm selon les espèces (4 pour les *Proteus*) peut être réalisé sur gélose contenant de la cloxacilline à 250 mg/L. Le CA-SFM recommande également le test des disques combinés. Ce test repose sur des disques contenant 30 μ g de céfotaxime, ceftazidime ou céfépime seuls ou associés à 10 μ g de clavulanate (Robin *et al.*, 2012).

Le test est positif si le diamètre d'inhibition augmente de 5 mm en présence d'inhibiteur. La détermination des CMI de ces trois molécules seules et présence de clavulanate peut également être utilisée, une diminution de trois dilutions de la CMI en présence de clavulanate signe la production de BLSE (Robin *et al.*, 2012).

Des tests basés sur la même logique, ont été développés pour la plupart des systèmes automatisés (Vitek2, Phoenix, API). Il s'agit soit d'une comparaison directe de CMI comme recommandé par le CA-SFM, mais avec des lectures plus rapides (API et Microscan), soit d'un test spécifique (Phoenix et Vitek2) (Robin *et al.*, 2012).

Dans les conditions recommandées pour leur utilisation, leurs performances sont proches de celles des tests réalisés par diffusion en gélose. La détection de BLSE faussement positive peut être liée à l'hyperproduction de pénicillinases plasmidiques ou de certaines β -lactamases chromosomiques. Quatre phénotypes principaux peuvent être observés (Robin *et al.*, 2012).

☒ Un phénotype associant une résistance à toutes les pénicillines seules ou associées aux inhibiteurs, aux C1G, ainsi qu'au céfépime et parfois une diminution de sensibilité au céfotaxime ou à la ceftriaxone et de légères images de synergies entre ces molécules et le clavulanate peut être observé chez des souches productrices d'enzymes de type OXA (Robin *et al.*, 2012).

☒ Un phénotype associant une résistance à toutes les pénicillines seules ou associées aux inhibiteurs, aux C1G, C2G ainsi qu'à l'aztréonam et parfois au céfépime et au céfotaxime, avec des images de synergie entre ces molécules et le clavulanate peut être observé chez des souches de *K. oxytoca* hyper-produisant leur enzyme chromosomique (Robin *et al.*, 2012).

☒ Un phénotype associant une résistance à toutes les pénicillines seules ou associées aux inhibiteurs, aux C1G, C2G ainsi qu'à la ceftazidime, avec un test de synergie faiblement positif entre la ceftazidime et le clavulanate peut être observé, de façon exceptionnelle, chez des souches hyper-produisant une pénicillinase (plasmidique ou chromosomique) (Robin *et al.*, 2012).

☒ Un phénotype typique de la production d'une BLSE peut être observé chez *S. fonticola* et dans les espèces de groupes 5 et 6 en cas d'hyperproduction de leur BLSE chromosomique.

☒ Un phénotype typique de la production d'une BLSE peut être observé chez *S. fonticola* et dans les espèces *P. vulgaris*, *P. penneri*, *K. ascorbata*, *K. cryocrescens*, et *Erwinia perscinia* et des espèces de *Citrobacter* (*C. amalonaticus*, *C. farmeri* et *C. sedlakii*) en cas d'hyperproduction de leur BLSE chromosomique (Robin *et al.*, 2012).

Dans les deux premiers cas, les caractéristiques atypiques de ces phénotypes (résistance préférentielle respective au céfépime et à l'aztréonam) peuvent permettre l'identification du mécanisme, alors que dans les deux cas suivants le phénotype ne permet pas toujours d'identifier de façon certaine le mécanisme en cause (Robin *et al.*, 2012).

III.1.3.2. Test de Hodge pour détecter les KPC et les métallo-carbapénèmases

Différents tests phénotypiques permettent de suspecter la production de carbapénèmases. Cependant, le test phénotypique le plus connu est le test de Hodge modifié (Robin *et al.*, 2012). Un disque d'ertapénème ou de méropénème est appliqué au centre d'une gélose MH ensemencée par une souche d'*E. coli* ATCC 25922. Trois souches sont ensemencées par stries : 1: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (témoin positif) ; 2: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (témoin négatif) ; 3: Souche testée. La déformation du diamètre à l'intersection entre une strie et la culture de *E. coli* ATCC 25922 signe la présence d'une hydrolyse des carbapénèmes par la souche testée. La souche testée (n°3) produit une carbapénèmase. Les disques utilisés sont : ertapénème (ERT) ou méropénème (MER) (Ouar-Korichi, 2011).

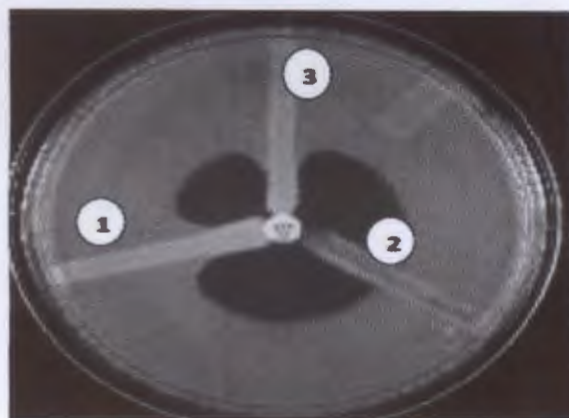


Figure 25. Test de Hodge modifié (Ouar-Korichi, 2011).

Après 16 -24 H d'incubation, les souches productrices de carbapénémase de type B vont pousser jusqu'au contact du disque d'ertapénème ou meropenème. Un test de Hodge modifié est positif quand *Escherichia coli* ATCC 25922 au contact d'une souche productrice de carbapénémase de type B, va pénétrer et croître dans le diamètre d'inhibition en donnant un aspect d'invagination de la culture. Un test de Hodge modifié est négatif quand il n'y a aucune modification du diamètre d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC 25922 au contact des souches à étudier (Ouar-Korichi, 2011).

III.2. Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire sont encore marginales en bactériologie. Elles restent principalement du domaine de la recherche. Elles permettent l'identification bactérienne par hybridation de séquences sélectionnées ou par séquençage de certaines cibles. Elles permettent aussi la détection de gènes de résistance aux antibiotiques et le typage de souches (Billy, 2002).

La plupart des tests de sensibilité génotypiques sont fondés sur les méthodes d'amplification d'un segment d'ADN portant sur une partie ou la totalité du gène de résistance. Il peut également s'agir d'une partie intrinsèque de gène bactérien au sein duquel peuvent être repérées des mutations de résistance. L'étape initiale consiste donc à amplifier l'acide nucléique recherché ou acide nucléique cible. En général, ce processus fait appel à la technique de la *polymerase chain reaction* (PCR), mais aussi l'amplification par sonde (exemple : la *ligase chain reaction*), et l'amplification de signal (exemple : la technique DNAb, ADN branché). Le produit obtenu par le biais de cette réaction est appelé un amplicon (Billy, 2002).

L'étape suivante consiste à confirmer que cet amplicon est l'ADN cible recherché correspondant à une partie ou à la totalité du gène de résistance. Cette étape utilise les techniques d'électrophorèse, analyse par sonde d'hybridation (*Southern blot*, Elisa = *enzyme linked immunosorbent assay*), analyse du polymorphisme de restriction (RFLP = *restriction fragment length polymorphism*) ou séquençage de l'ADN (Billy, 2002).

D'après les derniers progrès technologiques, une nouvelle méthode consiste en une technique d'hybridation sur un panel de séquences d'oligonucléotides d'ADN, correspondant à des micropuces biologiques (microchips). Une seule puce peut contenir des dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques spécifiques capables de détecter plusieurs gènes ou mutations de résistance à partir de matériel génétique issu d'un prélèvement. Dans la majorité des laboratoires, la technique PCR reste la plus utilisée (Billy, 2002).

III.2.1. Technique de la PCR

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait (Poitras et Houde, 2002).

La technologie PCR a rapidement évolué notamment la PCR quantitative en temps réel qui est considérée comme un outil valable pour la détection d'agents pathogènes émergents et la mise en évidence de résistance aux antibiotiques (Mathys *et al.*, 2007).

La PCR en temps réel est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase, à partir d'amorce sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde, tout au long de la réaction. Les amorces et la sonde, des oligonucléotides sont spécifiques des séquences d'ADN qui doivent être amplifiées. Elle peut être aussi utilisée pour détecter des acides ribonucléiques (ARN) (Tse et Capeau, 2003 ; Espy *et al.*, 2006).

Un cycle de PCR ou cycle d'amplification, est contrôlé par le changement de température de la réaction. Il est composé d'une étape de dénaturation de l'ADN, suivi de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Dernièrement, ces enzymes ont été optimisées de façon que les étapes d'hybridation et d'accroissement aient lieu à une température commune, réduisant le nombre d'étape par le cycle de PCR et augmentant donc la rapidité de la détection des ADN cibles (Tse et Capeau, 2003 ; Espy *et al.*, 2006).

Le niveau de fluorescence au cours de chaque cycle de PCR est rapporté au nombre de sonde se fixant sur leur ADN cible. Le nombre de brins d'ADN cible étant doublé à chaque cycle sous les conditions optimales. L'augmentation du signal fluorescent au cours de la réaction permet d'estimer la quantité de cibles initialement présente dans l'échantillon, plus particulièrement le nombre de cycles de PCR qu'il faut pour observer un signal fluorescent se détachant nettement du bruit de fond (Tse et Capeau, 2003 ; Espy *et al.*, 2006).

III.2.2. Exemple d'une PCR en temps réel pour la détection de gènes de carbapénèmases de *Klebsiella pneumoniae*

159 isolats cliniques comprenant des *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* ont été récupérés des échantillons cliniques multiples,

comme le sang, la blessure, le cathéter, l'urine de l'hôpital de Pékin Tongren. Ces isolats, sont résistants à plusieurs classes de β -lactamines en se basant sur l'antibiogramme. La confirmation des résultats de l'analyse est effectuée par PCR en temps réel (Lijun Wang *et al.*, 2012).

- **Détection de *bla KPC* par PCR en temps réel**

La séquence de l'amorce (5'-TTGTTGATTGGCTAAAGGG-3') et la séquence renversé (5'-CCATACTCCGCAGGTT-3'), ont été conçus dans la région conservatrice de plusieurs types du *bla KPC* (*bla KPC*-2 à *bla KPC*-13). L'amplicon du *bla KPC* est de 106 paires de bases.

Les paramètres de recyclage sont 5 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C, de 15 s à 55°C, et de 30 s à 72°C. La détection simple par fluorescence est effectuée dans chaque cycle à 55°C (Lijun Wang *et al.*, 2012).

Des courbes de fusion sont tracées juste après l'étape finale d'amplification en chauffant à 96°C pendant 5 s, suivie d'un refroidissement à 5°C pendant 1 minute, puis en chauffant lentement avec une augmentation de 0.11°C par seconde jusqu'à 96°C. Les courbes sont enregistrées en traçant l'intensité de signal de fluorescence avec la température.

En même temps, les KPCs de ces isolats cliniques ont été détectés par l'essai modifié de Hodge (MHT). La sensibilité de l'analyse en temps réel d'ACP par rapport au MHT est de 29/29 (100 %) avec une spécificité de 100 %. Cela, signifié que les résultats de PCR en temps réel et du MHT sont fortement accordés. Donc, l'analyse par PCR en temps réel peut fournir un test de dépistage utile pour détecter les gènes du *bla KPC* avec une exactitude et une rapidité (Lijun Wang *et al.*, 2012).

III.3. Méthodes biochimiques

Les méthodes biochimiques mettent en évidence des activités enzymatiques bactérienne. Deux tests de diagnostic rapide sont utilisés pour la détection de la résistance aux antibiotiques (Leclercq, 2004).

III.3.1. Carba NP test et BLSE NDP test

Deux tests de diagnostic rapide de multi-résistance aux antibiotiques de spectre large viennent d'être mis au point par l'Unité Inserm 914 dirigée par Patrice Nordmann. Ils sont appelés Carba NP test et ESBL NDP test (Nordmann/ Dortet/ Poirel). Ces tests permettent en moins de deux heures d'identifier certaines bactéries qui résistent aux antibiotiques les plus fréquents et les plus importants en clinique. Les bactéries cibles sont en particulier les entérobactéries (*Escherichia. coli*) (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).

Pour tenter de freiner ces résistances de plus en plus importantes, les chercheurs de l'Inserm ont mis au point un système de détection rapide de deux enzymes responsables de la résistance des bactéries à deux classes d'antibiotiques très fréquentes : les céphalosporines de spectre large et les carbapénèmes. **Dans ces tests, la présence d'une enzyme signe la présence d'une bactérie résistante (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).**

A l'heure actuelle, ces tests peuvent être réalisés à partir de bactéries isolées dans les urines lors d'une infection déclarée ou à partir des bactéries présentes dans les selles (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).

Elles sont fondées sur les propriétés d'acidification générée par l'activité des enzymes (β -lactamases et les carbapénémases) en présence de l'antibiotique. Si l'une de ces enzymes est présente, le milieu s'acidifie et l'indicateur d'acidité, pH vire de la couleur rouge au jaune (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).

Une utilisation de ces tests extrêmement performants permettra une adaptation individuelle des traitements antibiotiques et un meilleur contrôle de la diffusion des résistances aux antibiotiques, notamment, en milieu hospitalier (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).

Ces tests diagnostiques vont donc permettre une identification rapide de certaines bactéries devenues résistantes aux antibiotiques et donc d'adapter au mieux les traitements pour les patients infectés. Ils permettront aussi d'isoler les malades porteurs de ces bactéries résistantes pour éviter le développement d'épidémies hospitalières (Nau, 2012 ; Nordmann, 2012).

III.3.2. Spectrométrie de masse

La détection directe des déterminants (exemple, la protéomique) de résistance est demeurée incertaine, parce que beaucoup de protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques, telle que les β -lactamases, ne sont pas fréquemment exprimées aux niveaux élevés comparés à d'autres protéines bactériennes. Ceci, les rend presque impossible de les identifier et de les différencier du reste du spectre de protéine. Une solution à cette issue peut impliquer utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour détecter les métabolites produits de la réaction d'hydrolyse de β -lactamase (Ledeboer et Hodinka, 2011).

Le lien de la β -lactamase à un type de β -lactamine, augmente la masse moléculaire de ce dernier par plusieurs Daltons. Lors de la réaction d'hydrolyse, la masse de l'antibiotique devient plus basse. Ce changement de la masse peut être détecté en utilisant un spectromètre de masse. Le protocole consiste à une incubation d'un isolat bactérien en présence d'une β -lactamine pour 1 à 3 h, puis à analyser le surnageant de culture (le produit d'hydrolyse) (Ledeboer et Hodinka, 2011).

Conclusion

La résistance bactérienne aux antibiotiques touche un nombre élevé de souches bactériennes d'origine humaine et animale, parmi eux les différentes souches de la famille des *enterobacteriaceae* qui sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux et possédant, surtout, les phénomènes de résistances acquises par plasmide qui ont pris une importance considérable.

Cette résistance, se développe et diffuse à travers le monde bactérien grâce à des facteurs responsables (mutations génétique, acquisition des gènes de résistance ou par pression de sélection à l'hôpital et dans l'environnement extrahospitalier), comme les BLSE résultant de mutation sur le gène de β -lactamase commun des entérobactéries.

De nombreux tests, réalisés *in vitro*, permettent l'étude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Ces méthodes sont effectuées en pratique courante par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) comme l'antibiogramme par dilution sur milieu liquide ou solide ou par diffusion en milieu solide (méthode des disques) ou par des techniques automatisées. Ainsi, des méthodes biochimiques et de biologie moléculaire sont introduites dans les laboratoires de microbiologie en raison d'étude de la résistance aux antibiotiques.

Les méthodes biochimiques sont basées sur la détection par spectromètre de masse, des produits d'une réaction catalysée par les enzymes hydrolysant les antibiotiques comme les β -lactamases, ou la détection par changement de l'indicateur de pH ; le virage de la couleur du milieu à cause de l'acidification du milieu. Ces techniques apportent une aide pour le choix d'un traitement adapté. De plus, les méthodes de biologie moléculaires sont largement appliquées.

L'utilisation de ces tests rapides pour la détermination de la sensibilité d'une souche aux antibiotiques et la détection du mécanisme de résistance des souches résistantes présente de nombreux avantages pour le suivi de l'antibiothérapie et surtout au niveau hospitalier.

Bibliographie

Bibliographie

[A]

- ☒ **Anglaret X et Mortier E.(2004).** Adénopathie superficielles d'origine infectieuse. Maladies infectieuses. 3^{ème} édition. Amazon, France. P : 20.
- ☒ **Avril J-L., Henry D., François D et Henri M.(1992).** *Enterobacteriaceae.* Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. PP : 149-151-153,156, 163, 166, 168,183-185,187-192,198.

[B]

- ☒ **Barron S.(1996).** *Pasteurella, Yersinia, and Francisella.* Medical Microbiology. 4th edition. Texas. P: 25.
- ☒ **Berche P., gaillard J.L., Simonet M.(1988).** «les bactéries des infections humaines» Bactériologie. Flammarion. Paris. P : 575, 576, 581.
- ☒ **Belmonte O., Drouet D., Alba J., Moiton M.P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C et Jaffar-Bandjee M.C.(2009).** Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi ; **58** (1) : 18-24.
- ☒ **Bergogne-Berezin E., Thabaut A., Durosoir M- J., Berthelot G et Courtoux D. (1977).** L'antibiogramme automatique. *Médecine et maladie infectieuse.* Paris : 15.
- ☒ **Bernier M., Catelain F., Philippon A.(2001).** Place des nouveaux automates dans un laboratoire de bactériologie. Elsevier, Paris; **8** : 50, 51.
- ☒ **Billy C.(2002).** Détection génotypique des résistances bactérienne : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaire. France ; **12** : 193.
- ☒ **Branger A., Richer M-M et Roustel S.(2007).** Contrôler pour évaluer la qualité. Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri éditions, Dijon. P : 104.
- ☒ **Brion J-D., Buxeraud J., Castel J., Couquelet J., Caussac M., Debaert M., Fournier J.P., Fulcarand P., Muet J., Lacroix R., Laranze J.Y., Le Baut G., Loiseau P., Paris J., Plat M., Poisson J., Tronche J.(1992).** Médicament antibiotique. Lavoisire. Paris. PP : 278-279, 337,356, 422.
- ☒ **Bustany P., Chaumet-Riffaud P-D.(1993).** Internat nouveau programme. Pharmacologie. Tom 17. Heures de France : 70.

[C]

- ☒ **Carle S.(2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Montréal ; **42** : 150.
- ☒ **Caron F.(2012).** L'antibiogramme : un quadruple outil pour le clinicien Antimicrobial susceptibility testing A four facets tool for the clinician. Elsevier, Masson ; **14** (4) : 34.
- ☒ **Cattoir V.(2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. *Pathologie biologie.* France : 52 ; 609.
- ☒ **Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E.(2004).** β -lactamines. Elsevier. Paris : 129-202 134-136, 138, 141.

[D]

- ☒ **Deboscker Y., et Dubreuil L.(2000).** Antibiotiques antiviraux, anti-infection. John Libbey Eurotext. Paris. P : 73.
- ☒ **Delarras C.(2007).** *Enterobacteriaceae*. Principaux microorganismes recherchés en routine. Microbiologie pratique pour le laboratoire. Lavoisier : 247,255-258, 263,265, 274,275.
- ☒ **Delglin J.H., Vallerand April Hazard.(2008).** Guide des médicaments. 3^{ème} édition. DANGER. Canada. PP: 204, 207, 211.
- ☒ **Denis F., Ploy M-C., Martin C., Bingen E et Quentin R.(2007).** Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier, Masson : 14,16.
- ☒ **Duval J ; Soussy C-J .(1990).** Propriétés des différents antibiotiques. Antibiothérapie. 4^{ème} édition. Masson. Paris. PP: 5, 6, 75- 76, 113, 132, 134,155- 156.
- ☒ **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H et Stackebrandt. E.(2006).** The procyote: Proteobacteria: gamma subclass. 3rd edition. P: 215.

[E]

- ☒ **Espy MJ. UHL. JR., Sloan LM et al.,(2006).** Real-time PCR in clinical microbiology: application of routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* ; **19**: 165-256.

[F]

- ☒ **Federighi M.(2005).** Les salmonelles. Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition. Economica. Paris. P: 6.

[G]

- ☒ **Gaudy C et Buxeraud J.(2005).** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier. France : 9, 22,25.
- ☒ **Gennéa D., Siegrist Hans H.(2003).** De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse* ; (20) : 468.
- ☒ **Gouraud P et Van Gompel A.(2000).** Repères en microbiologie. 3eme édition. Louvain GARANT. P : 81.
- ☒ **Guillot J.F.(1989).** Bases moléculaire et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactériens. Elsevier. France : 1, 2, 5.
- ☒ **Guillou M.L. Joly.(2006).** Intérêt de l'E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Ann Rech Vet.* Elsevier. France ; **21** : 237, 238.
- ☒ **Guiraud. J-P.(2003).** Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. PP : 80-85.

[H]

- ☒ **Houssni H., Berkli H., Madani H., Azzouzi A.(2011).** L'antibiogramme. Résistance aux antibiotiques: une responsabilité partagée. Faculté de Médecine et de Pharmacie Oujda. PP : 8, 9.
- ☒ **Huet C.(2007).** Principe de mesure de la sensibilité aux antibiotiques CMI /CMB. Elsevier, Masson, Paris; (88):1.

[K]

- ☒ **Kang Cl., Kim SH., Park WB., et al.(2005).** Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of

inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother*; **49**: 760-6.

- ☒ **Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.(2005).** Medical microbiology. Amazon. France: 225.
- ☒ **Kempf I., Zeitouni S.(2009).** Cout biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquence. *Pathologie Biologie*. Elsevier. France : 9.
- ☒ **Kfoury- Samaha., Joumana N., Araj George F.(2003).** Recent developments in β -lactamase and extended spectrum β -Lactamase. Department of Pathology and Laboratory Medicine, American University of Beirut Medical Center: 1210, 1211.

[L]

- ☒ **Lausanne J. Bile et Zurich R. Zbinden.(2013).** Adaptation par les laboratoires de microbiologie en Suisse de la norme EUCAST pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques: implications microbiologiques et cliniques; **17**: 7.
- ☒ **Leclercq R.(2004).** Le diagnostic rapide des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Masson. Paris ; **6** :180-184.
- ☒ **Ledeboer et Hodinka.(2011).** Molecular Detection of Resistance Determinants. *Journal of Clinical Microbiology*; **49** (9): 20-24.
- ☒ **Le Minor L., Sansonetti Ph., Richard Ci., Grimont F., Mollart H.H., Bercovier H., Et Alonso J.M.(1989).** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Flammarion. Paris. PP: 389, 391, 392, 394, 395, 400, 403, 406, 408, 411, 412, 451, 457.
- ☒ **Le Minor., Véron M. (1989).** Bactériologie médicale. Flammarion, Paris. PP: 274-278, 280.
- ☒ **Leyral Guy., Bourdais Evelyne Verne., Bonnefory Caroline., Guillet Françoise.(2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine : 177.
- ☒ **Lijun Wang., Haitong Gu., Xinxin Lu.(2012).** A Rapid Low-Cost Real-time PCR for the Detection of *Klebsiella pneumonia* Carbapenemase Genes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; **11** (9): 1-6.

[M]

- ☒ **Madigan Michael et Martinko John.(2007).**Diversité des procaryotes : *les bactéria*. Biologie des micro-organismes. Pearson Education France : 354,355, 796.
- ☒ **Maiti Samarendra. N., Kamalesh Babu Ruppa P., Rudong Shan.(2006).**Overcoming Bacterial Resistance: Role of β -Lactamase Inhibitors. Springer. Verlag Berlin Heidelberg: 209.
- ☒ **Marcel J.P.(2005).** L'antibiogramme et son impact médical. Elsevier, Masson; **7**: 56, 57.
- ☒ **Mathys V., Lefèvre P., Fontaine V., Dehem M., Donnio P.Y., Février F., Le coustoumier A, Bifani P.(2007).** La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. Elsevier. Masson ; **9** : 205.
- ☒ **Mc Millan J.A ., Feigin R.D., De Angelis C.D., Douglas Jones M.(2006).** Oski's pediatrics ; principales and practices. 4th edition. A Wolters Kluwer business : 916.
- ☒ **Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F., Lafon. R.(1991).** Le diagnostic. Les maladies des plantes maraichères. INRA, Paris : 50.
- ☒ **Meyer A., Deiana J., Bernard A.(2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition. Doin. France. P : 89.

- ☒ **Moiüy D, Cavallo J-D, Weber P, Fabre R.(2001).** Détection et surveillance épidémiologique des résistances bactériennes aux antibiotiques en milieu communautaire. Elsevier. France : 31.
- ☒ **Muller Matthew P., Frepc M.D.(2004).** Résistance des bactéries Gram négatif due aux β -lactamases. *Maladies infectieuses et Microbiologie*. 3-ES-430A Toronto General Hospital 200 Elizabeth Street, Toronto, Ontario : 121-017,125.

[N]

- ☒ **Nau Jean-Yves.(2012).** Résistances aux antibiotiques : deux tests de diagnostic rapide bientôt sur le marché. *Rev Med Suisse* ; 8 (359) : 2034-2035.
- ☒ **Nauciel C et Vildé J.L.(2005).** Bactéries d'intérêt médical ; Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Masson, Paris. PP : 49, 59, 121, 124, 125, 132, 135-137.
- ☒ **Nordmann. A.(2005).** L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les entérobactéries. Elsevier. France : 7.
- ☒ **Nordmann C.P.(2012).** Mise en point de deux tests de diagnostic rapide de résistance aux antibiotiques. Faculté de médecine, Paris : 1.

[O]

- ☒ **Ouar- Korichi M.N.(2011).** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale. 6^{ème} édition (Médecine Humaine et Vétérinaire). Document édité avec la collaboration de l'OMS : 65.

[P]

- ☒ **Paterson David., L et Bonomo Robert A.(2005).** Extended- spectrum β -lactamases: a Clinical Update. American Society for Microbiology: 658.
- ☒ **Patrick G. L.(2003).** Chimie pharmaceutique. 2^{ème} édition. Paris. P: 426.
- ☒ **Philippon A.(2008).** Résistance bactérienne : définition, mécanisme, évolution. Elsevier. Masson. Paris : 2, 4.
- ☒ **Philippon A et Arlet G.(2006).** β -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement thérapeutique. *Ann Bio Clin*, Paris : 38.
- ☒ **Poitra E., et Houd A.(2002).** La PCR en temps reel: Principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, Canada, 2 : 2.
- ☒ **Pommerville J.C.(2009).** Alcano's Fundamentals of microbiology. P:846.
- ☒ **Porwollik Steffen.(2011).** New approaches in subspecies-level- *Salmonella* classification. *Salmonella: from genome to function*. Caister academic press: 02.
- ☒ **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003).** Microbiologie. 2^{ème} édition. De Boeck. France. P : 787.

[R]

- ☒ **Rambaud Jean Claude., Buts Jean-Paul., Corthier Gerard., Flourié Bernard.(2004).** Flore microbienne intestinal. Pathologie digestive. John Libbey Eurotext, Paris: 227.
- ☒ **Robin Frédéric., Gibold Lucie., Bonnet Richard.,(2012).** Résistances naturelles et acquise chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires*. Elsevier Masson : 54.
- ☒ **Roger G Finch., Greenwood David., Norrby S Ragnar., Whitley Richard J.(2003).** Antibiotic and chemotherapy. 8th edition. MPG books Ltd, BODMIN, London. P: 16.

[S]

- ☒ Scavizzi. M., Labia. R., Petitjean. O, Elbhar. A.(2000). L'antibiogramme: de l'analyse des populations bactérienne à la thérapeutique. Masson, Paris ; 2 : 122, 124.
- ☒ Soussy Claude-James.(2004). Entérobactéries : antibiogramme des fluoroquinolone. *Biologie médicale*. Elsevier. France : 90-05-0150.
- ☒ Stora D.(2010). Généralité sur les entérobactéries. Pharmacologie. 4^{ème} édition. Woltes Kluwer, France. P : 44.

[T]

- ☒ Thierry É.(1994). Les antibiotiques. Editions Nathan. Paris. PP : 7, 9,10, 44.
- ☒ Tse C., Capeau J.(2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin*, 61 : 279-293.

[V]

- ☒ Vaubourdelle M.(2007). Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques. *Infectiologie*. 3^{ème} édition. Wolters Kluwer SA. France. PP : 226, 230, 358.

[W]

- ☒ Weber Michèle.(2003). Les pièges de l'antibiogramme. Elsevier, Paris : 21. 352.
- ☒ Woods. J. L.1995. In vitro testing of antimicrobial agents. *Inf, dis. Clin*: 9, 463-481.



Glossaire

Glossaire

Arthrite. C'est une inflammation aiguë ou chronique des articulations son origine peut être rhumatismale ou infectieuse.

Bactériémie. Elle désigne la présence de bactéries pathogène dans le sang.

Cholécystite. C'est l'inflammation de la vésicule biliaire. Elle est liée à l'infection du liquide vésiculaire et est le plus souvent secondaire à une obstruction du canal permettant son déversement dans l'intestin, par un calcul biliaire.

Endocardite. Une endocardite est une inflammation de l'endocarde (structure et enveloppe interne du cœur, incluant les valves cardiaques).

Gastro-entérite. C'est une infection inflammatoire du système digestif pouvant entraîner de la nausée, des vomissements, des crampes abdominales, de la diarrhée ainsi que de la déshydratation et de la fièvre.

Infection de blessure. Est exposée à des infections à cause de l'utilisation de matériel contaminé ou du fait que la blessure est proche de l'ouverture de l'urètre et de l'anus.

Infection des voies respiratoires. Sont particulièrement exposées aux infections. des agents microbiens dans l'air sont inhalés ou aspirés à partir des sécrétions colonisées ou infectées de la cavité buccale et du rhinopharynx. Les infections de voies respiratoires hautes comprennent les angines, les sinusites et les otites, les infections de voies respiratoires basses comprennent la bronchite aiguë la pneumopathie aiguë.

Infection pulmonaire. Elle désigne une inflammation de l'appareil respiratoire causé par des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites pénètrent à l'intérieur des poumons et s'y développent.

Infection urinaire. C'est défini par la colonisation des urines par des bactéries, ce qui se traduit le plus souvent par des signes infectieux urinaires. Il existe deux types principaux ; la cystite (infection de la vessie) et la pyélonéphrite (infection du rein).

Méningites. C'est une inflammation des méninges, la membrane qui entoure le système nerveux central. Elles sont le plus souvent d'origine infectieuse, virale ou bactérienne.

Ostéomyélite. C'est une inflammation de la moelle osseuse et du tissu osseux adjacent, causée par une infection. Lorsqu'un os est infecté la moelle osseuse exerce une pression contre les vaisseaux sanguins de l'os. L'infection de l'os est due par Staphylocoque venu par voie sanguine. Les Salmonelles sont aussi responsables.

Péritonite. C'est l'inflammation du péritoine. Ce dernier est une membrane couvrant tous les organes de l'abdomen.

Salpingite. C'est une inflammation d'une ou plus souvent des deux trompes de fallope ; l'un des constituants de l'appareil génital féminin.

Septicémie. C'est une infection de l'ensemble de l'organisme, due à un germe qui s'est développé dans une zone précise puis s'est propagé via la circulation sanguine.

Suppuration. C'est la présence à l'intérieur d'une cavité qui soit formé au cours d'une infection, soit qui est déjà existant.

Réalisé par: Bousba hala Boussebt Houda	Date de soutenance: 10 /06 /2013
Encadreur: Yousefi Khadidja	
Thème: Les méthodes utilisées pour l'étude de la résistance chez les entérobactéries	
<p>Résumé :</p> <p>Les entérobactéries présentent un pouvoir pathogène très large, certaines souches peuvent être responsables de gastroentérites ou des infections graves. D'autres, sont des bactéries opportunistes et souvent impliquées dans les infections nosocomiales. A côté de cette gravité de maladies qu'ils renferment, ces bactéries sont sensibles à différents types d'antibiotiques qui agissent sur plusieurs niveaux, les plus souvent appliqués sont les β-lactamines. Malheureusement, les entérobactéries deviennent insensibles à ces antibiotiques grâce à des modifications génétiques. Cette résistance au cours du développement est devenue un problème chez les patients infectés, pour cette raison les microbiologistes ont pensés de mettre en œuvre des techniques pour la détection de mécanismes des résistances qui sont présentées dans ce manuscrit.</p> <p>Mots clés : la résistance bactérienne, les entérobactéries, techniques biochimiques, techniques de biologie moléculaire.</p>	
<p>Abstract :</p> <p><i>Enterobacteriaceae</i> present a very broad pathogenic capacity, certain stocks can be responsible for serious gastrointestinal tract or infections. Others are bacteria opportunist and often implied in the infections nosocomial Concurrently to this gravity of diseases which they contain, these bacteria are sensitive to various types of antibiotics which act on several levels, most often applied are the β-lactamines. Unfortunately, <i>Enterobacteriaceae</i> become insensitive to these antibiotics because of genetic modifications. This resistance during the development became a problem among infected patients, for this reason the microbiologists thought of implementing techniques for the detection of mechanisms of resistance which are presented in this manuscript.</p> <p>Key words: bacterial resistance, <i>Enterobacteriaceae</i>, biochemical techniques, techniques for molecular biology.</p>	
<p style="text-align: right;">المخلص :</p> <p>تسبب بكتيريا الأمعاء أمراض عديدة كالتعفنات و التهابات المعدة. مع وجود هذه الأمراض الحادة التي تسببها فلقد أصبحت حساسة للحديد من المضادات الحيوية التي تؤثر على مختلف مستوياتها. للأسف أصبحت بكتيريا الأمعاء تقاوم هذه المضادات و هذا راجع الى التغير الفجائي في الجينات الوراثية لهذه البكتيريا المعوية مما سبب مشاكل صحية كبيرة للأشخاص المصابين مما أدى بالمكروبيولوجيين الى التفكير بوضع و اكتشاف تقنيات تسمح لهم بمعرفة الآليات التي تسبب المقاومة و التي هي موضحة في هذه المذكرة.</p> <p>الكلمات المفتاحية: المقاومة البكتيرية, بكتيريا الامعاء, تقنيات بيوكيميائية, تقنيات البيولوجيا الجزيئية.</p>	

