



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



Université Abbès Laghrou Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Option : Microbiologie Générale

Intitulé :

Bêta- lactamases à spectre élargi : profil de résistance des souches isolées et mise en évidence au laboratoire

Présenté par :

BOUZIANE Houda

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^r DARBOUCHE Abdelhak .

Pr Université de Khenchela

Encadreur : M^r KASSAH LAOUAR Ahmed

Pr CHU de Batna

Examinatrice : M^{elle} YAKHLEF Wahiba.

M.A. Université de Khenchela

Année Universitaire : 2012-2013

Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya Kayoum "

Je dédie ce mémoire :

A Mon cher père et ma chère mère

Vous avez comblés ma vie de tendresse d'affection et de compréhension. Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon bien être, et la poursuite de mes études dans de bonnes conditions.

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte.

Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mes adorables sœurs : Imen, Soumia et son mari Ridha

A mon seule et unique frère : Mourad Nabil et sa femme Assia

A zaki pour son aide, son appui et surtout pour ses encouragements et ses motivations.

A mes chères amies : Amina Moussaoui , Saliha, Kahina, Dalel, Salima, Aicha, Amina T, Karima, Hadjer, Insaf , hamida, Zahra, Aya, Imen , Afaf , hala , da3boula

A mes cousins et cousines, oncles et tantes, à toute ma famille et surtout ma petite Hidaya

A toutes mes amies de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Houda

Remerciements

A

*Mon Maître et Encadreur de mémoire Monsieur le Professeur KASSAH LAOUAR Ahmed
Médecin chef de laboratoire central de microbiologie au CHU Benflis Touhami de Batna*

*Je souhaite remercier mon directeur de mémoire, M^r. KASSAH LAOUAR Ahmed, Professeur et
Médecin chef de laboratoire central de microbiologie au CHU Benflis Touhami de Batna. Je lui
suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités
pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je
lui adresse ma gratitude pour tout cela.*

A

Mon Maître Et Président du jury Monsieur Le Professeur DARBOUCHE Abdelhak

*Je tiens à le remercier pour avoir **'accepter de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de mon
profond respect.***

A

Mon Maître Et Juge De mon Mémoire mademoiselle Yekhlaf Wahiba

*Je tiens à la remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury, d'avoir porté un intérêt à ce
travail.*

Je tiens à exprimer mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie du CHU de Batna, à leur tête Mme le docteur Salhi, Madame Le Docteur Nezzar , Et Madame Le Docteur Boumaaraf pour leurs précieux conseils et leur disponibilité.

J'associe à ces remerciements Les docteurs Selma, Noussaiba, Et Faiza Bouziane.

A tout le personnel des Services Des brûlés et de la Réanimation Médicale Pour Leurs Disponibilité et Sympathie.

Je désire en outre remercier tous les membres de Laboratoire De La Grande Clinique Mezdaouet :

Rachid, Fatima, Hassina, Mounira, Samiha Et Nadia Pour Leur gentillesse.

Table De Matière

Pages

Introduction 1

1^{ère} Partie : Connaissances Actuelles

Chapitre I : *ENTEROBACTERIES*..... 3

1. Définition.....3

2. Habitat3

3. Morphologie.....3

4. Culture.....3

5. Structure antigénique.....4

6. Pouvoir pathogène.....4

7. Infection associées..... 4

7.1 *Escherichia coli*.....4

7.2 *Klebsiella pneumoniae*.....5

7.3 *Serratia marcescens*.....5

7.4 *Salmonella*.....5

7.5 *Shigella*.....6

7.6 *Enterobacter*.....6

7.7 *Proteus mirabilis*.....6

Chapitre II : LES B-LACTAMINES

1. Définition des antibiotiques7

2. les β -lactamines..... 7

3. Famille des β -lactamines.....8

3.1.Les pénicillines10

3.2.Les céphalosporines11

3.3.Les carbapénèmes13

3.4.Les monobactames14

3.5.Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique,
tazobactam,sulbactam)15

1.

Paroi bactérienne.....16

2. Mode d'action des β -lactamines.....	17
3. Mécanismes de résistance bactérienne aux β -lactamines	18
3.1.Définition.....	18
3.2.Les types de résistance	18
3.3.Les niveaux de résistance	18
3.4.Mécanisme d'apparition des résistances	18
3.5.Le support génétique de la résistance.....	19
3.5.1. Les résistances mutationnelles ou mutations chromosomiques.....	19
3.5.2. Les résistances extra chromosomiques	19
3.5.3. Les plasmides	20
3.5.4. Les transposons.....	20
3.5.5. Les intégrons	20
4. Mécanismes de résistance enzymatique aux β -lactamines	21
5. Résistance par production de β -lactamases.....	24
Chapitre III : LES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI	25
1. Historique.....	25
2. Définition et mécanisme d'action.....	28
3. Classification.....	29
3.1.Classification d'Ambler.....	29
3.2.Classification de Bush-Jacobi-Medeiros.....	30
4. Les phénotypes de résistance des bacilles à Gram négatif aux β lactamines	32
4.1 Résistances naturelles des entérobactéries aux β -lactamines.....	32
4.2 Résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines.....	34
5. Production de β -lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables.....	35
6. Production de céphalosporinases chromosomiques par des bactéries à Gram négatif.....	36
7. Différents types de BLSE.....	37
7.1. Anciennes BLSE.....	37
7.1.1. BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient).....	37
7.1.2. BLSE de type SHV (Sulphydryl variable).....	37
7.2.Nouvelles BLSE	38

7.2.1	BLSE de type CTX-M (Céfotaximase - Munich).....	38
7.2.2	Distribution des CTX-M	39
7.2.3	Co-résistance et CTX-M.....	40
7.2.4	BLSE de type PER (<i>Pseudomonas</i> extended resistance).....	40
7.2.5	BLSE de type VEB (Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamas).....	40
7.2.6	BLSE de type GES (Guyana Extended-Spectrum β -lactamase).....	40
7.2.7	BLSE de type OXA (Oxacillinase).....	40
8.	Les mutations ponctuelles (TEM et SHV)	40
9.	Anciennes : mutation de TEM et SHV.....	41

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Chapitre I : Cadre d'étude de CHU de Batna et de la Grande Clinique

Mezdaouet.....	44
----------------	----

II. Matériels et méthodes..... 48

1. Matériels.....	48
2. Souches bactériennes (échantillonnage)	48
3. Période d'étude.....	48
4. Lieu d'étude	48
5. L'origine des prélèvements.....	48
6. Nature des échantillons.....	48
7. Méthode d'étude.....	49
a) Techniques de prélèvement.....	49
b) Examen cytobactériologique.....	49
c) Observation microscopique avec coloration de Gram.....	50
8. Méthodes d'isolement et d'identification à partir des prélèvements.....	50
a) Méthode d'isolement.....	50
b) Méthode d'identification des Entérobactéries.....	50

9. Détermination de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques (l'antibiogramme).....	51
10. Phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	50
10.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi.....	50
10.2. Méthodes de détection de la BLSE.....	50
➤ Test de synergie.....	52
10.3 Tests complémentaires.....	55
➤ Test du double disque (test espagnol).....	55
➤ Test du rapprochement des disques.....	56
➤ Test à la cloxacilline.....	57
10.4 Détermination du phénotype de résistance des BLSE.....	58
➤ Les phénotypes rares.....	59
III. Résultats	60
1. Répartition des Entérobactéries.....	60
2. Répartition des BLSE chez les Entérobactéries.....	61
3. Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne.....	62
4. Répartition des BLSE positives selon l'origine.....	63
5. Répartition des BLSE positives selon les prélèvements.....	64
6. Répartition des BLSE positives selon les services.....	65
7. Répartition des BLSE positives selon l'âge.....	66
8. Répartition des BLSE positives selon le sexe.....	67
9. Répartition des BLSE positives selon les 3 mois.....	68
10. Répartition des BLSE positives selon la région.....	69
11. La résistance associée aux β -lactamines.....	70
12. Répartition des BLSE associées aux CHN.....	71
IV. Discussion.....	73
V. Conclusion	75
VI. Références Bibliographiques.....	77
VII. Annexes.....	83

Liste de figures :

Figure	Titre	Pages
01	Structure chimique du noyau β -lactame	08
02	Structure de base des pénicillines	08
03	Les pénicillines	10
04	Les céphalosporines	12
05	Structure des carbapénèmes	14
06	Structure chimique de l'acide clavulanique	15
07	Structure de la paroi des bactéries	17
08	Schéma illustrant les différents mécanismes biologiques de résistance aux antibiotiques	22
09	Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame	26
10	les différentes classes de β -lactamases selon la classification d'Ambler.	30
11	Représentation en 3D d'une β -lactamase de type TEM	37
12	Schéma de l'évolution des TEM-1/2	41
13	Schéma de BLSE type TEM en fonction de la mutation plasmidique	42
14	Schéma de BLSE type SHV en fonction de la mutation plasmidique	42
15	Schéma de démarche de l'analyse bactériologique	50
16	Souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de β -lactamase à spectre élargi (Bouchon de champagne).	53
17	Souche d' <i>Escherichia coli</i> ne produit pas de β -lactamase à spectre élargi (l'absence d'une image de synergie).	55
18	Test du double disque (test espagnol) pour la détection des BLSE.	56
19	Images de synergie entre AMC et β -lactamines (CAZ, CTX)	57
20	Test à la cloxacilline	58
21	Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE.	59
22	Répartition des Entérobactéries.	60
23	Répartition des BLSE chez les Entérobactéries	61
24	Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne.	62
25	Répartition des BLSE positives selon l'origine géographique d'isolement	63
26	Répartition des BLSE positives selon le site du prélèvement.	64
27	Répartition des BLSE positives selon les services.	65
28	Répartition des BLSE positives selon l'âge.	66
29	Répartition des BLSE positives selon le sexe.	67
30	Répartition des BLSE positives selon les trois mois	68
31	Répartition des BLSE positives selon la région	69
32	La résistance associée aux β -lactamines	70
33	Répartition des BLSE associées aux CHN	71

Liste de tableaux :

Tableau	Titre	Pages
01	Résistances naturelles des entérobactéries aux β -lactamines	32
02	Présentation des phénotypes de résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines	33
03	Répartition des Entérobactéries	60
04	Répartition des BLSE chez les Entérobactéries.	61
05	Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne	62
06	Répartition des BLSE positives selon l'origine géographique d'isolement	63
07	Répartition des BLSE positives selon le site du prélèvement.	64
08	Répartition des BLSE positives en fonction des services	65
09	Répartition des BLSE positives selon l'âge.	66
10	Répartition des BLSE positives selon le sexe	67
11	Répartition des BLSE positives selon les trois mois	68
12	Répartition des BLSE positives selon la région.	69
13	La résistance associée aux β -lactamines	70
14	Répartition des BLSE associées aux CHN	71

Liste des abréviations

Ac : Acide clavulanique

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AK : Amikacine

AMC :Amoxicilline+ A.claculanique

AML : Ampicilline

API20E: Analytical profile index 20E (E= Entérobaceries)

ARN: Acide ribonucléique

ATM : Aztréonam

BCP : Bleu de bromocrésol pourpre

BGN: Bacilles à Gram négatif

BLSE : β -lactamase à spectre étendu (traduit en anglais ESBL extended-spectrum β -lactamase)

BPS : Bactéries Pathogènes Spécifiques

BPO : Bactéries Pathogènes Opportunistes

C : Chloramphénicol

CAZ : Céfotazidime

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

C1G: Céphalosporine de première génération

C2G: Céphalosporine de deuxième génération

C3G: Céphalosporine de troisième génération

C.D : Phénotype céphalosporinase dérégulée

CHN: Céphalosporinase de haut niveau

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

C.Ind : Phénotype céphalosporinase inductible

CIP : Ciprofloxacine

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMT : Complexe Mutants TEM

CN : Gentamicine

CRO :Céftriaxone

CTX : Céfotaxime

CTX-M : Céfotaximase-munich

CXM : Céfuroxime

ECBU : Etude Cytobactériologique des Urines

ECB de pus : Etude Cytobactériologique de pus

FEP : Céfépime

FOX: Céfoxitine

GES: Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase

HC : Hémoculture

I : Intermédiaire

IMP : Imipénème

KF : Céfalotine

LCR: Liquide céphalorachidien

LDC: Lysine décarboxylase

LPS : Lipo-polysaccharides

NAG :N-acétylglucosamine

NAM : Acide N-acétylmuramique

PBN: Phénotype pénicillinase de bas niveau

PER : *Pseudomonas* extended resistance

PHN: Pénicillinase de haut niveau

PLPs: Protéine liant les pénicillines

PS : Phénotype Sensible

R : Résistant

S : Sensible

SHV : Sulfhydryl variable

SXT : Sulfamides + Triméthoprim

SFM : Société Française de Microbiologie

spp : Espèce

TEM : D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

Tn : Transposon

TRI : Phénotype Pénicillinase Résistante aux Inhibiteurs des bêta-lactamases

VEB: Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase

OXA :Oxacillinase

Zn⁺² : Zinc.

Introduction

I. Introduction :

Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant [1], qui affecte de nombreux pays, bien que la fréquence des souches résistantes soit différente d'un pays à l'autre.

A la faveur de l'introduction des céphalosporines de troisième génération en thérapeutique, les entérobactéries sont devenues multirésistantes par la production d'enzymes : céphalosporinase hyperproduite, β -lactamase à spectre élargi (BLSE) [2].

Chez les entérobactéries, le mécanisme prédominant de résistance aux bêtalactamines est la production de bêta-lactamases [3]. Les bêta-lactamases sont des enzymes hydrolysant les bêta-lactamines en ouvrant le cycle bêta-lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question [4]. Les bêta-lactamases sont classées selon des bases fonctionnelles et moléculaires (classification d'Ambler ou de Bush).

Les BLSE sont des enzymes sécrétées par les entérobactéries qui leur confèrent une résistance à la plupart des bêta-lactamines (pénicilline, céphalosporines, aztreonam) [5]. Elles sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM (Temoneira - nom du patient), SHV (Sulphydryl variable), CTX-M (Céfotaximase -Munich) [6].

Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries, à la différence des mécanismes de résistance de type chromosomique, non transmissibles en dehors d'une épidémie bactérienne [7].

Les BLSE, d'abord identifiées en Allemagne, sont individualisées dans tous les continents. Elles sont à l'origine d'épidémies d'infections hospitalières en France [2]. Elles sont individualisées chez plusieurs espèces d'entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* [1, 2,8].

Dans cette optique, j'ai entrepris une étude sur les entérobactéries sécrétrices des β -lactamases à spectre élargi isolées au laboratoire central de Microbiologie au CHU de Batna et le laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet à Khenchela dans la période de 15 Mars à 31 Mai 2013 avec comme objectifs :

- De déterminer les fréquences d'isollements des souches productrices des BLSE positives ;
- De connaître leur répartition en fonction des prélèvements, l'âge, le sexe, le service, des mois ;
- D'établir le profil de résistance associé à d'autres familles.

Connaissances Actuelles

Chapitre I

II. ENTEROBACTERIES

1. Définition :

Dans La famille des *Enterobacteriaceae* sont regroupés les bacilles à Gram négatif qui sont soit mobiles avec une ciliature péritriche, soit immobiles, non sporulés ; aérobies et anaérobies facultatifs ; qui cultivent sur des milieux ordinaires à base d'extrait de viande ; qui fermentent le glucose avec ou sans production de gaz ; qui possèdent une nitrate-réductase (réduction des nitrates en nitrites) à l'exception de certaines souches d'*Erwinia* et quelques rares mutants ; leurs cultures donnent toujours une réaction négative des oxydases. Enfin les entérobactéries possèdent une catalase à l'exception des *Shigella dysenteriae* du sérotype 1 [9].

2. Habitat :

Le nom d'entérobactéries avait été donné à cette famille parce que beaucoup des membres qui la composent sont des hôtes du tube digestif. Mais cette localisation n'est pas exclusive chez l'homme et les animaux, on les isole du sol et des végétaux qui sont même le gîte habituel de certaines espèces, tels les *Enterobacter agglomerans* et les *Erwinia* [9].

3. Morphologie :

Ce sont des bacilles à Gram négatif asporulés. Certains genres sont composés de bactéries toujours immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*), d'autres sont mobiles par ciliature péritriche. La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella* [9].

4. Culture :

Les entérobactéries aérobies-anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples.

Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R).

Les colonies des bactéries capsulées telles que les *Klebsiella* sont mucoïdes, plus grandes que les colonies S avec une tendance à la confluence [9].

5. Structure antigénique :

Chez les entérobactéries on peut distinguer :

- Des antigènes de paroi ou antigènes O toujours présents.
- Des antigènes flagellaires ou antigènes H.
- Des antigènes de surface (capsule ou enveloppe) [9].

6. Pouvoir pathogène:

Sur le plan de la pathologie humaine, il convient de distinguer :

- **Les bactéries pathogènes spécifiques (BPS)** que l'on ne trouve pas à l'état commensal (en dehors des porteurs sains) et dont la présence en milieu extérieur n'est qu'un phénomène de transit. Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les *Salmonella*, les *Shigella* et les *Yersinia*.
- **Les bactéries pathogènes opportunistes (BPO)**, elles peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente. Les infections ont donc un point de départ endogène. Toutefois, elles se trouvent par excrétion dans la nature à l'état transitoire et si elles n'engendrent généralement pas d'infections, elles sont cependant le signe d'une contamination fécale voire de défaut d'hygiène [9].

7. INFECTIONS ASSOCIEES :

Les entérobactéries représentent plus de 80% des bacilles à Gram négatif isolés aux laboratoires de microbiologie [10].

7.1. *Escherichia coli* :

E. coli est un germe très courant, trouvé en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. *E. coli* cause principalement des infections du tube digestif (gastroentérites), et on distingue 5 pathovars :

- *E. coli* entérotoxigène (diarrhées infantiles) ;
- *E. coli* entérotoxinoxigène (tourista) ;
- *E. coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales) ;

- *E.coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes) ;
- *E.coli* entéroadhérant (diarrhées du voyageur).

C'est également le germe préférentiel des infections urinaires (impliqué dans 80% des infections du tractus urinaire).

E. coli peut aussi coloniser le vagin et générer des méningites néonatales suite au passage du nouveau-né à travers la voie génital maternelle colonisée [10].

7.2. *Klebsiella pneumoniae* :

K. pneumoniae est un germe commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. C'est aussi un germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, des infections urinaires, des pneumopathies et des septicémies [10].

7.3. *Serratia marcescens* :

Longtemps considérée comme un saprophyte, *S. marcescens* se comporte de plus en plus souvent comme un pathogène opportuniste responsable à l'hôpital, d'infections nosocomiales, urinaires, pulmonaires, cutanées ou bactériémiques [10].

7.4. *Salmonella* :

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes à transmission oro-fécale elles constituent un vaste groupe de bactéries composé de plus de 2000 sérovars, leur pouvoir pathogène est différent pour les salmonelles majeures (que l'on ne trouve que chez l'homme) et les salmonelles mineures (ubiquistes).

- Les salmonelles majeures : *S. typhi*, *S. paratyphi*, sont respectivement responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.
- Les salmonelles mineures : responsables de gastro-entérites (bactéries entéro-pathogènes invasives). Elles sont impliquées dans 30 à 60 % des infections alimentaires.

7.5. *Shigella* :

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines. Elles sont responsables de l'historique « dysenterie bacillaire » (*shigella dysenteriae*).

Actuellement, elles sont la cause, chez l'adulte, de colites infectieuses et chez l'enfant, de gastro-entérites sévères avec diarrhée mucopurulente et sanglante, fièvre et déshydratation [10].

7.6. *Enterobacter* :

Les souches des genres *Enterobacter* sont souvent responsables d'infections nosocomiales. *E. cloacae* et *E. aerogenes* peuvent être à l'origine d'infections urinaires.

7.7. *Proteus mirabilis* :

C'est un germe commensal du tube digestif de l'homme et des animaux. ; En bactériologie médicale, les *Proteus* sont isolés de différents types d'infections, notamment au cours d'infections urinaires, respiratoires hautes ou de bactériémies [10].

Chapitre II

LES β -LACTAMINES :

1. Définition des antibiotiques :

Le mot antibiotique signifie au sens étymologique : **contre** (anti) les **organismes vivants** (biotiques). Le mot biotique signifie ici plus précisément contre les bactéries.

Au sens strict, les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique ; ils sont élaborés par des microorganismes, champignons et diverses bactéries. Cependant, quelques-uns sont maintenant produits par synthèse et beaucoup parmi les produits employés actuellement sont des dérivés semi-synthétiques préparés par modification de produits de base naturels ayant les propriétés suivantes :

1. Activité antibactérienne.
2. Activité en milieu organique.
3. Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme.

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des microorganismes à des concentrations tolérées par l'hôte [11].

2. Les β -lactamines :

Les β -lactamines représentent la plus importante famille d'antibiotiques par le nombre de molécules disponibles et par le volume d'utilisation, aussi bien en ville qu'à l'hôpital. Cette utilisation importante est due à leur large spectre d'action, leur efficacité, leur faible toxicité et à leur faible coût pour de nombreuses molécules.

L'histoire des β -lactamines débute dans les années 1930 par les observations de Sir Alexander Fleming concernant un agent antibactérien dénommé pénicilline isolé à partir du champignon *Penicillium notatum* [12]. Il faudra attendre le début des années 1960 pour voir apparaître les premières synthèses de β -lactamines permettant leur développement à l'échelle industrielle [13]. Cependant, l'utilisation large des β -lactamines depuis plus de 60 ans s'est accompagnée d'une augmentation importante de la résistance bactérienne à ces antibiotiques. Et le développement de nouveaux antibiotiques, notamment contre les bactéries à Gram négatif, connaît un franc ralentissement depuis plus de 10 ans.

3. Famille des β -lactamines:

La base commune à toutes les β -lactamines est le noyau β -lactame (Figure 1). À partir de ce cycle, quatre sous-familles ont été développées par adjonction de chaînes latérales : les pénicillines (ou pénames), les céphalosporines (ou céphèmes), les monobactames et les carbapénèmes [14]. Toutes ces molécules présentent des caractéristiques communes ainsi que des particularités propres à chaque classe, notamment en termes de spectre antibactérien.

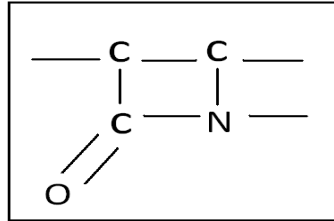


Figure 1: Structure chimique du noyau β -lactame [15].

3.1. Les pénicillines :

La formule générale des pénicillines associe un noyau β -lactame à un cycle thiazolidine et une chaîne latérale en C-6 (Figure 2). Le groupe des pénicillines est constitué d'un nombre important de molécules dont les principales sont :

- Benzylpénicillines : pénicilline G.
- Aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline.
- Uréidopénicillines : pipéracilline.
- Carboxypénicillines : carbénicilline, ticarcilline.

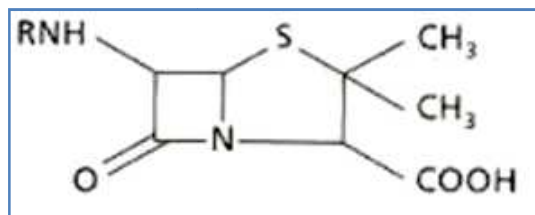


Figure 2: Structure de base des pénicillines [16].

Spectre d'action des pénicillines :

- Benzylpénicillines : bactéries à Gram positif, anaérobies, certaines bactéries à Gram négatif ;

- Aminopénicillines : bactéries à Gram positif, anaérobies, cocci à Gram négatif et certaines espèces d'entérobactéries (essentiellement *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* et *Shigella* spp.) ;
- Carboxypénicillines et uréidopénicillines : spectre réduit vers les Gram positif, spectre élargi vers les Gram négatif, incluant notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* [14].

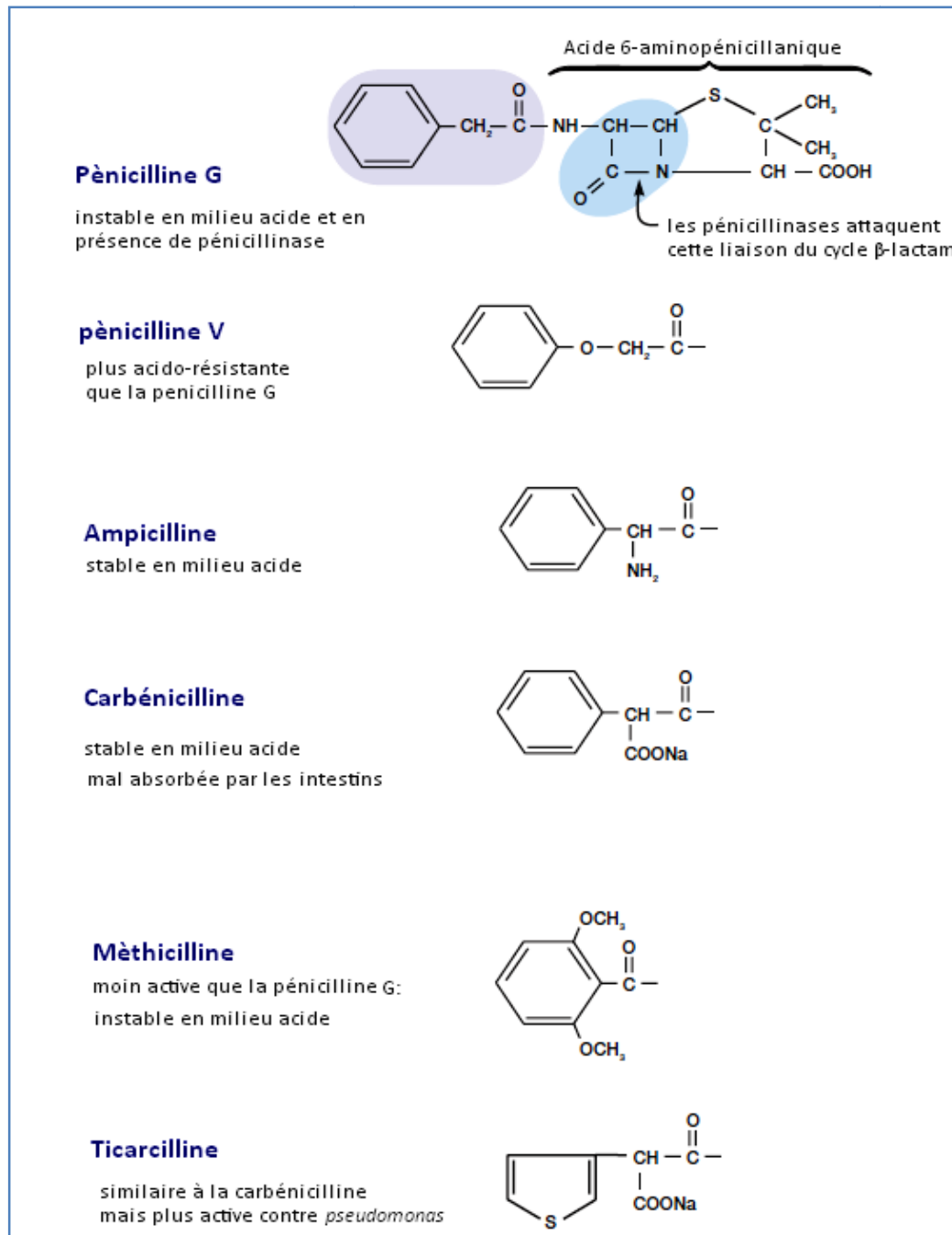


Figure 3: les structures et les caractéristiques des pénicillines. [17].

3.2. Les céphalosporines :

Les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (Figure 4). On distingue quatre générations de céphalosporines. Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés. En voici quelques exemples :

- Première génération : céfalotine, céfazoline.
- Deuxième génération : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine.
- Troisième génération : céfotaxime, céftazidime, céftriaxone.
- Quatrième génération : céfépime, céfpirome.

Les céphalosporines de première génération ont un spectre d'action qui se limite aux cocci à Gram positif et à quelques bacilles à Gram négatif ne produisant pas de céphalosporinase. Ces molécules sont, d'autre part, aisément dégradées par les β -lactamases [14].

L'amélioration la plus importante fut apportée par l'apparition des céphalosporines de troisième génération. L'addition de différents groupements chimiques a permis d'augmenter de façon considérable la stabilité de ces molécules et leur activité antibactérienne vis-à-vis des bacilles à Gram négatif. Ces molécules restent cependant hydrolysées par les céphalosporinases hyperproduites ainsi que par les BLSE.

Les céphalosporines dites de quatrième génération possèdent la propriété de résister à l'hydrolyse des céphalosporinases hyperproduites grâce à une double caractéristique. Elles possèdent une très faible affinité pour ces céphalosporinases ainsi qu'une bonne affinité pour les protéines liant les pénicillines (PLP). Ainsi, elles agissent avant que les enzymes bactériennes n'aient eu le temps de les dégrader. Ces molécules sont particulièrement efficaces vis-à-vis des bacilles à Gram négatif [14]. Même si les céphalosporines de quatrième génération sont plus stables à l'hydrolyse par les β -lactamases à spectre étendu, elles demeurent néanmoins hydrolysées par les plus efficaces d'entre elles.

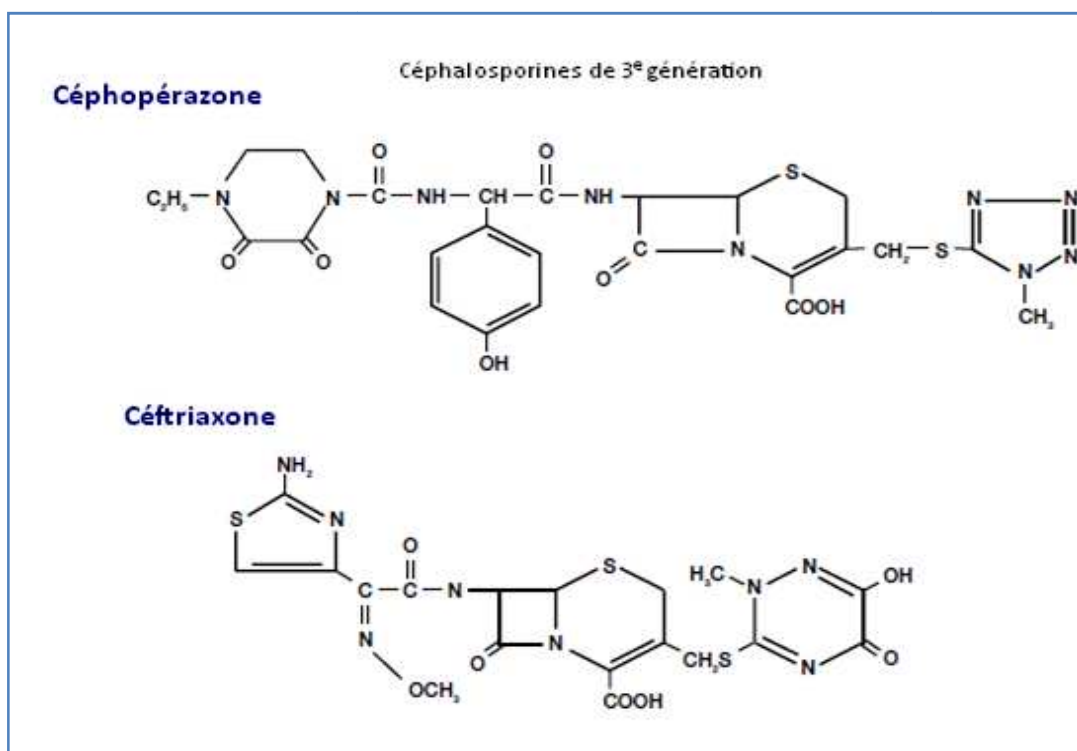
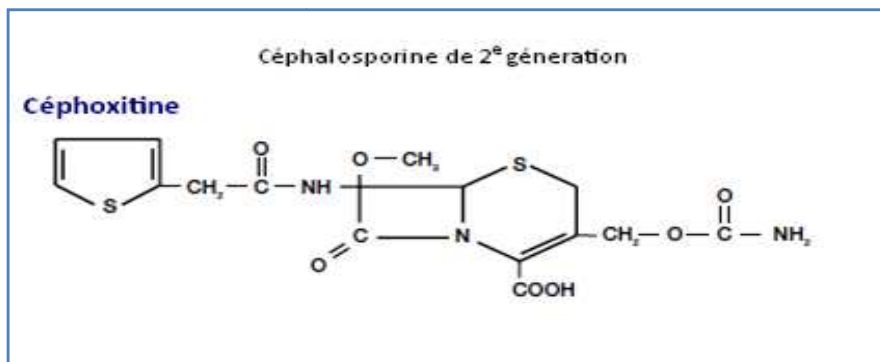
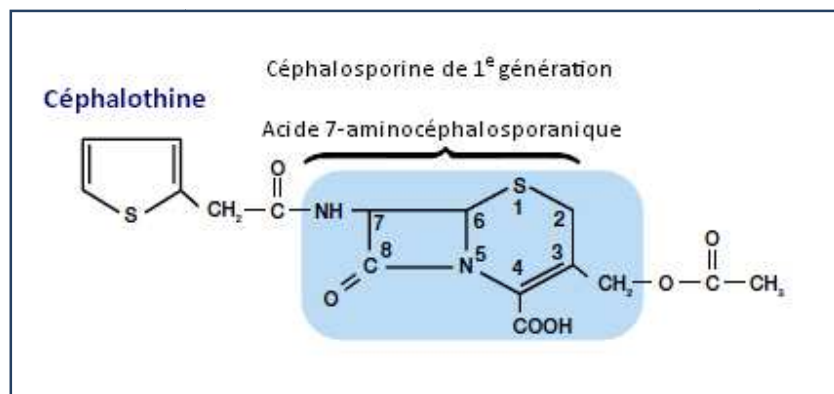


Figure 4: Les différentes classes des céphalosporines [17].

3.3. Les carbapénèmes :

Les carbapénèmes sont des β -lactamines possédant un très large spectre anti-bactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. Elles sont historiquement considérées comme le traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif [18]. Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème (Figure 5).

Les carbapénèmes sont actives sur les bactéries à Gram positif, sauf les staphylocoques résistants à la méticilline et *Enterococcus faecium* résistant à l'ampicilline. Les entérobactéries sont très sensibles aux carbapénèmes, y compris les souches productrices de BLSE et les souches productrices de céphalosporinase à haut niveau. L'imipénème, le doripénème et le méropénème ont une activité comparable sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* [18]. *Stenotrophomonas maltophilia* et certains isolats de *Clostridium difficile* sont résistants aux carbapénèmes.

Initialement, seuls les bacilles à Gram négatif producteurs de métallob-lactamases, de carbapénémases de la classe A de Ambler ou présentant une imperméabilité à l'imipénème pouvaient être résistants aux carbapénèmes. Actuellement, l'émergence de β -lactamases de classe D possédant un spectre étendu aux carbapénèmes remet en question l'efficacité de ces molécules en clinique. Les carbapénémases de classe D ont surtout été décrites chez *A. baumannii* [19].

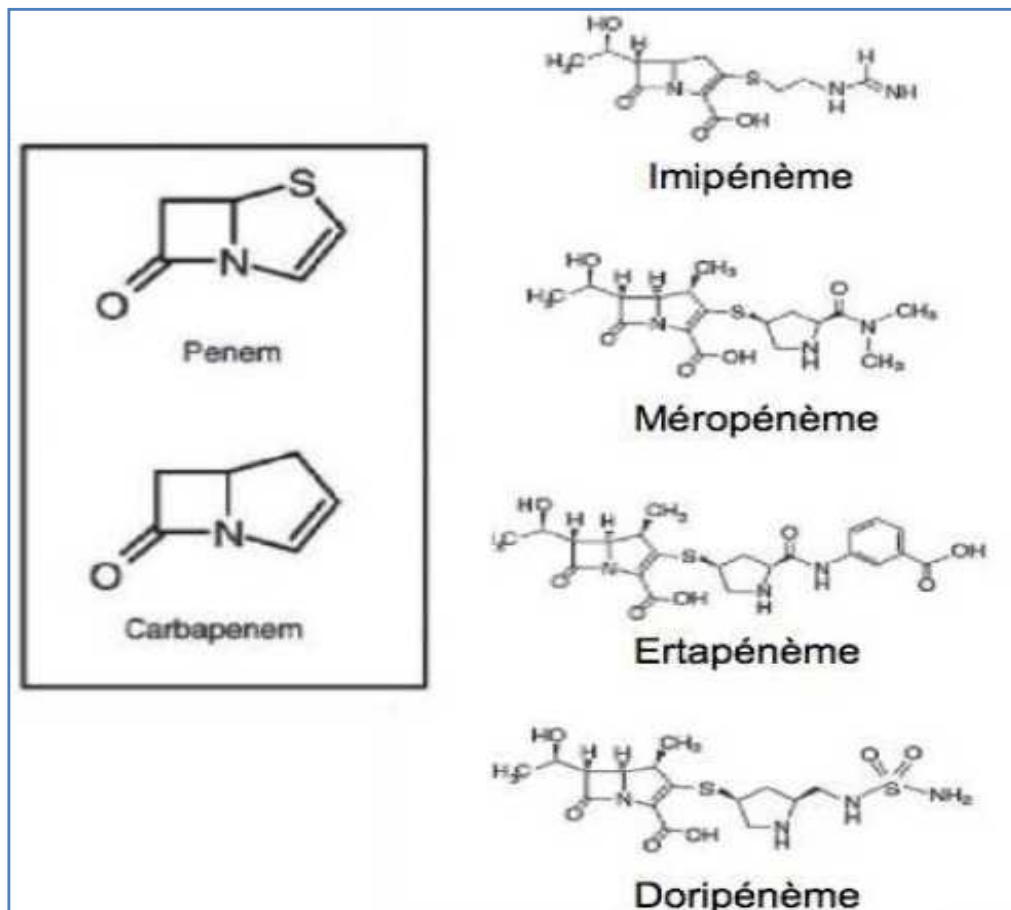


Figure 5 : Structures des carbapénèmes [19].

3.4. Les monobactames :

À la fin des années 1970, toutes les nouvelles β -lactamines identifiées étaient produites par les *Actinomycetes*. Sykes et son équipe entreprennent alors la recherche de nouveaux antibiotiques produits par d'autres organismes : ils découvriront les monobactames [20]. Les monobactames sont des β -lactamines monocycliques inactives sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies. Ces antibiotiques sont, en revanche, très actifs sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*. L'activité anti Gram-négatif de l'aztréonam, chef de file de cette classe, est globalement comparable à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération comme la ceftazidime. L'aztréonam présente une bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases de spectre restreint. De plus, les monobactames constituent les seules β -lactamines non hydrolysées par les métallo- β -lactamases.

3.5. Les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam) :

Les inhibiteurs des β -lactamases ont été développés afin de neutraliser la production bactérienne de β -lactamases. Les premières recherches sur la découverte des inhibiteurs des β -lactamases débutèrent vers la fin des années 1960 et c'est en 1976 qu'est découvert l'acide clavulanique (figure 6) produit par une souche de *Streptomyces clavuligerous* [21]. En 1981, une combinaison de l'acide clavulanique avec de l'amoxicilline, suivie peu de temps après par une combinaison entre l'acide clavulanique et la ticarcilline sont commercialisées.

La découverte de l'acide clavulanique et son introduction dans la pratique médicale ont été suivies par la découverte de plusieurs inhibiteurs de β -lactamases comme le sulbactam et le tazobactam [13]. Les inhibiteurs des β -lactamases possèdent une activité antibiotique généralement faible. Ce sont des substrats-suicide qui se lient de manière irréversible à la β lactamase, empêchant l'action de celle-ci sur les β -lactamines. Ceci explique pourquoi les inhibiteurs des β -lactamases, en particulier l'acide clavulanique et le tazobactam, ne sont généralement pas utilisés seuls, mais en association avec un antibiotique comme l'amoxicilline, la ticarcilline ou la piperacilline. Le sulbactam possède, en plus de son effet inhibiteur irréversible sur les β -lactamases, une activité antibiotique intrinsèque sur quelques espèces bactériennes comme *A. baumannii*.

Malgré leur intérêt en pratique médicale, les inhibiteurs des β -lactamases ne permettent pas d'inactiver l'ensemble des β -lactamases produites par les bactéries.

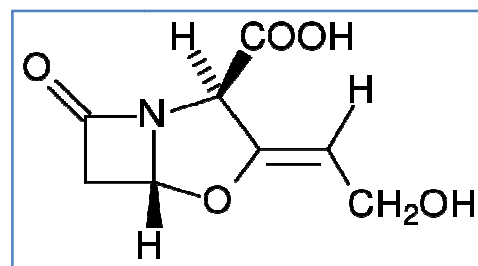


Figure 6: Structure chimique de l'acide clavulanique [21].

4. Paroi bactérienne :

Les β -lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par le biais d'une liaison à des cibles moléculaires spécifiques.

Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi bactérienne puisqu'il est responsable de la forme de la bactérie et lui assure une protection physique et chimique. Il est présent chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, même si la constitution de la paroi de ces deux types de bactéries diffère (Figure 7). Le peptidoglycane est une macromolécule réticulée constituée par de longues chaînes glycaniques pontées par des chaînons peptidiques. Chaque chaîne glycanique est constituée d'une alternance régulière de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Chaque unité NAM est substituée par un tétrapeptide constitué de L-alanine, d'acide D-glutamique, de L-lysine (ou d'acide diaminopimélique selon l'espèce), et de D-alanine. Ces tétrapeptides sont reliés à ceux d'une autre chaîne glycanique par des liaisons dont la nature varie d'une espèce à l'autre. Cet ensemble forme un réseau tridimensionnel rigide entourant la membrane cytoplasmique de la bactérie et délimitant ainsi un espace périplasmique [22].

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue en trois étapes se déroulant successivement dans le cytoplasme, dans la membrane cytoplasmique puis dans l'espace périplasmique. Le peptidoglycane est une structure dynamique qui est continuellement synthétisée et hydrolysée au cours du cycle cellulaire (Figure 7) [22].

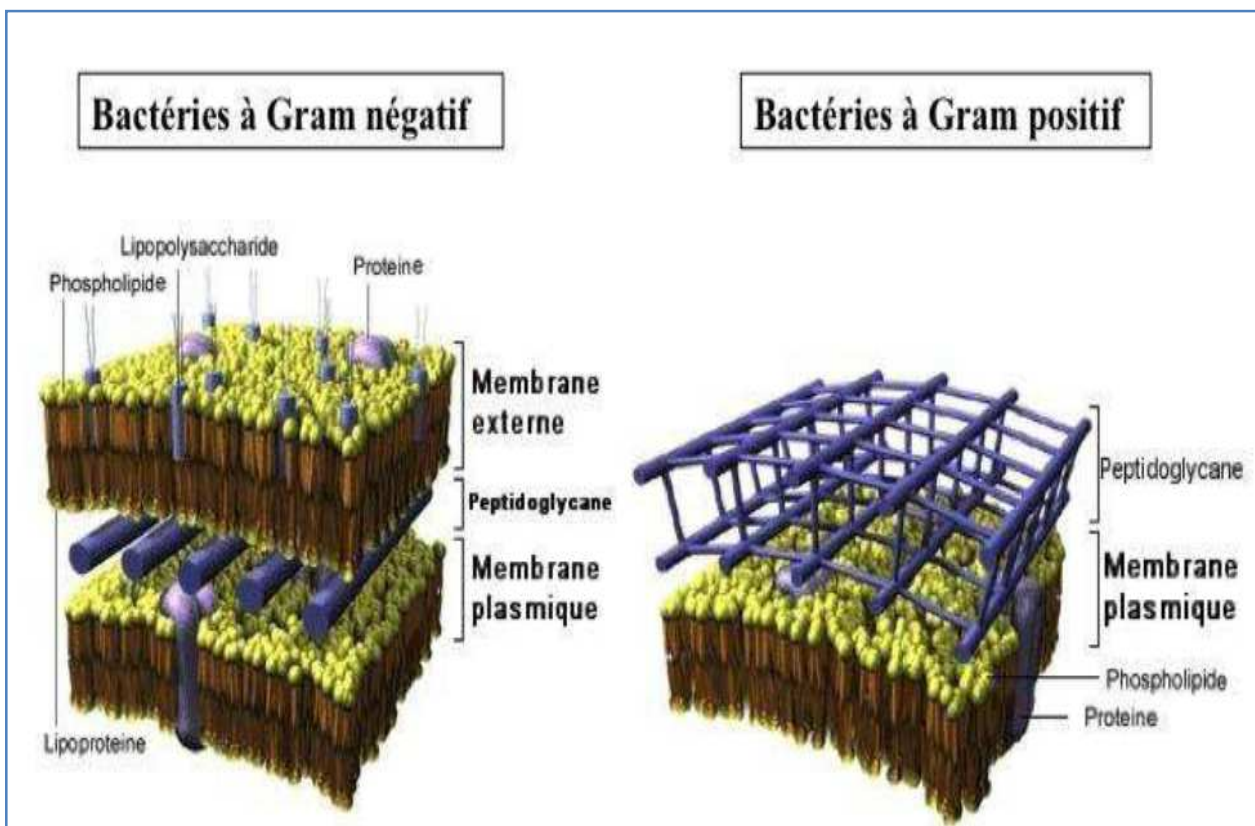


Figure 7 : Structure de la paroi des bactéries [22].

5. Mode d'action des β -lactamines :

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui interfèrent avec la dernière étape périplasmique de la synthèse du peptidoglycane. Leurs cibles sont les transpeptidases et les carboxypeptidases, enzymes également appelées PLPs (protéines liant les pénicillines). La nature de ces PLPs est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à l'autre. La structure des β -lactamines mime la séquence D-ala-D-ala qui constitue le substrat naturel des PLPs. Les β -lactamines se fixent de façon covalente au niveau du site actif de l'enzyme par réaction d'acylation. La liaison PLP β -lactamines ainsi formée a deux conséquences :

- Elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique) ;
- Elle entraîne une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide) [22].

6. Mécanismes de résistance bactérienne aux β -lactamines :

6.1. Définition :

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration plus élevée de cet antibiotique que la concentration qui inhibe la majorité des souches de la même espèce [23].

6.2. Les types de résistance :

Il existe des

- ❖ résistances naturelles : leur mécanisme sur le génome bactérien, est constant dans un taxon et est généralement chromosomique. Elles correspondent à la résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique. Elles sont dues soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique. Par exemple les entérobactéries sont résistantes aux macrolides [23].
- ❖ résistances acquises dues à des modifications génétiques, chromosomiques ou plasmidiques. Elles ne concernent que quelques souches, d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique donné [23].

6.3 Les niveaux de résistance :

On parle de résistance de bas niveau lorsque la croissance des bactéries est arrêtée par de faibles doses d'antibiotique et de résistance de haut niveau lorsque cette croissance bactérienne est stoppée par de fortes concentrations d'antibiotique [23].

6.4.Mécanisme d'apparition des résistances :

Il existe deux mécanismes :

- ❖ la transmission verticale

Lorsque les conditions de vie deviennent désagréables, la bactérie peut muter et transmettre à sa descendance la résistance.

- ❖ la transmission horizontale

Les bactéries peuvent être parasitées par des virus dont l'ADN code une multirésistance aux antibiotiques. Elle est responsable de la majorité des résistances [24].

6.5.Le support génétique de la résistance :

- ❖ La résistance naturelle est sur le génome bactérien.
- ❖ La résistance acquise est due à une mutation chromosomique ou à une acquisition de gène (résistance extra chromosomique).

6.5.1. Les résistances mutationnelles ou mutations chromosomiques :

Elles sont dues aux mutations de gènes existants.

Elles sont :

- spontanées : elles existent avant l'utilisation d'antibiotique et ne sont donc pas provoquées par la présence d'antibiotique.
- stables : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien
- spécifiques : elles ne concernent qu'un seul antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques. Dans ce cas, la résistance à un antibiotique peut aboutir à une résistance croisée pour des antibiotiques appartenant à une même famille.
- rares : le taux de mutation est faible et est de l'ordre de 10^{-7} et 10^{-8} [24].

6.5.2. Les résistances extra chromosomiques :

Elles ont pour support un plasmide ou un transposon. Ce mécanisme de résistance est certainement le plus fréquent en clinique (80 à 90% de souches résistantes).

Elles ont les caractéristiques suivantes :

- elles sont fréquentes : c'est cette forme de résistance qui est la plus souvent rencontrée.
- elles sont contagieuses et ont une transmission horizontale entre bactéries cohabitantes de même espèce ou d'espèces différentes. Elles peuvent concerner plusieurs antibiotiques ou plusieurs familles d'antibiotiques et peuvent entraîner des poly résistances [24].

6.5.3. Les plasmides :

Ce sont des molécules d'ADN bicaténaires, circulaires extra chromosomiques, douées de réplication autonome, qui sont transmises de façon stable au cours des générations et qui peuvent exister séparément du chromosome bactérien ou y être intégrées

Une bactérie pathogène est fréquemment résistante aux antibiotiques parce qu'elle contient un plasmide de résistance porteur d'un ou de plusieurs gènes de résistance : ce sont des plasmides R (plasmides de résistance).

Un plasmide R dans une cellule peut être rapidement transmis à d'autres cellules par des mécanismes d'échange génétique tels que la conjugaison (par simple contact entre bactéries ou par contagion directe), la transduction (par l'intermédiaire d'un vecteur qui peut être un virus de bactérie, un bactériophage), la transformation.

Les plasmides de résistance sont rencontrés principalement chez les staphylocoques (chez qui ils sont transmis par transduction) et les bacilles Gram négatif (chez qui ils sont transmis par conjugaison) [24].

6.5.4. Les transposons :

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon sur un autre (transposition intermoléculaire) ou en un autre site du même réplicon (transposition intra-moléculaire), en absence d'homologie entre les ADN qui interagissent et indépendamment des fonctions de recombinaison réciproque de la bactérie-hôte.

Le caractère transposable chez la majorité des gènes est responsable de l'apparition des souches multi-résistantes [24].

6.5.5. Les intégrons :

Les intégrons sont de nouveaux éléments génétiques contenant un ou plusieurs gènes de résistance sous forme de cassettes. Les cassettes sont des unités mobiles qui peuvent être facilement intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase présente sur l'intégrons. Les intégrons ont surtout été étudiés chez les bactéries à Gram négatif mais ont aussi été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif (Corynébactéries, Entérocoques). Ils jouent un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien. La découverte récente de super-intégrons hébergeant une centaine de cassettes dont certaines codant pour des fonctions différentes de la résistance aux antibiotiques suggère en fait un rôle plus large des intégrons qui seraient impliqués dans l'évolution des génomes bactériens et dans l'adaptation des espèces [25].

7. Mécanismes de résistance enzymatique aux β -lactamines :

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines externe [26, 27,28] :

- Modification de la cible (PLP) qui les rend moins sensibles aux β -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale ;
- la synthèse des enzymes (β -lactamases) qui inactivent les β -lactamines par modification chimique ;
- l'acquisition ou la surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration ;
- la modification des porines chez les bactéries à Gram négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des β -lactamines à travers la membrane externe.

Ces résistances peuvent être naturelles (chromosomiques) et/ou acquises (chromosomique / plasmidique / transposon).

La résistance enzymatique est universellement répandue au sein de très nombreux genres bactériens. Les β -lactamases constituent le mécanisme de résistance principal des Bacilles Gram Négatif (BGN), chez lesquels elles sont très diversifiées. En effet, depuis l'introduction dans les années 80 de β -lactamines très stables à l'inactivation enzymatique (céphalosporines de 3^{ème} génération ou C3G, aztréonam et carbapénèmes), une émergence continue et universelle de

nouveaux enzymes a pu être observée. Ces enzymes sont le plus souvent plasmidiques ou transférables à des Bacilles Gram Négatif comme *Klebsiella pneumoniae* essentiellement, *Pseudomonas aeruginosa* et maintenant aux *Acinetobacter spp.*

Les gènes codant pour les β -lactamases ou ceux impliqués dans la régulation de leur expression peuvent être impliqués dans ce mécanisme de résistance enzymatique.

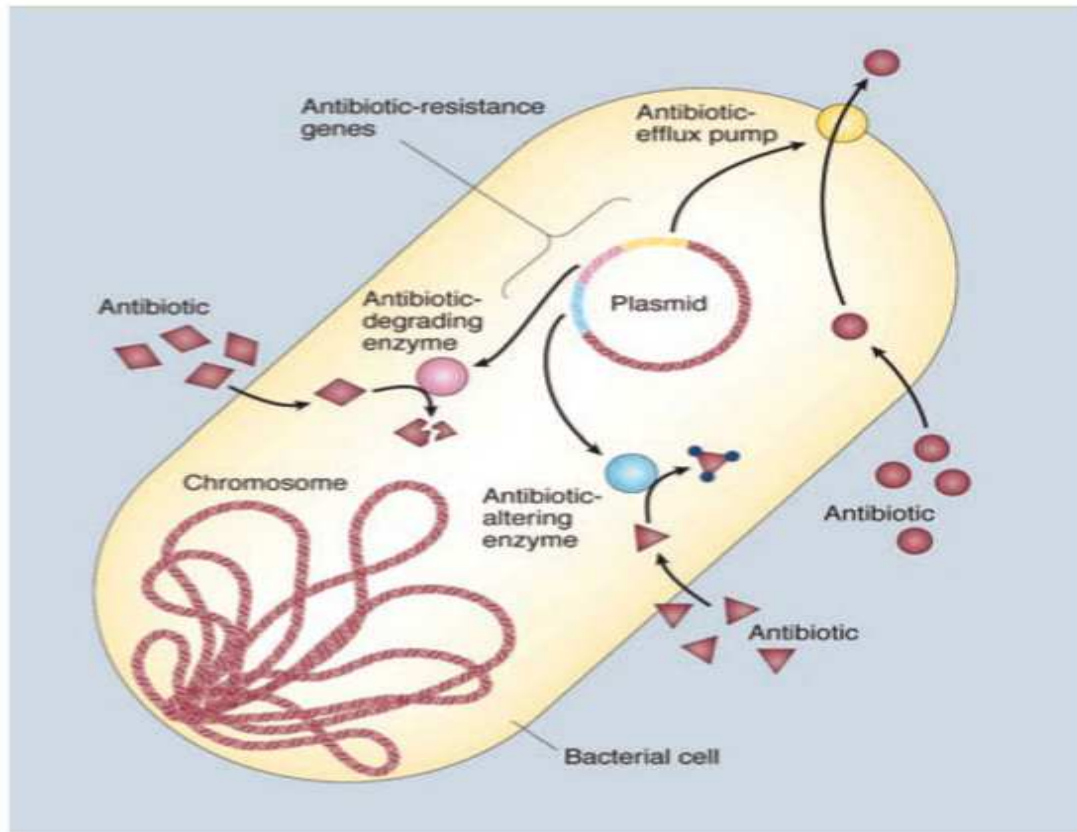


Figure 8 : Schéma illustrant les différents mécanismes biologiques de résistance aux antibiotiques [29]

8. Résistance par production de β -lactamases :

La production des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des β -lactamines [30]. Plus de 290 types de β -lactamases sont décrits. Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne [31].

La dissémination des β -lactamases communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutantes sont reliées directement à l'utilisation abusive des β -lactamines dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture [32,33].

Généralement, les β -lactamases sont classées suivant deux schémas : la classification de Ambler et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros [34]. La classification moléculaire tient compte de la structure primaire des différentes β -lactamases et les divise en quatre classes (A à D). Pour la classification fonctionnelle, les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des β -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. Quoique différents de par le principe [34].

Les β -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des β -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo- β -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques.

La classe A est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram positif, les β -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines de 3^{ème} génération et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs suicides (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam) utilisés en médecine. Les principaux représentants de ce groupe sont les β -lactamases du type TEM, SHV et très récemment le type CTX-M [34].

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactam ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam [35]. Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains Bacilles à Gram Négatif. Au départ à médiation chromosomique, les β -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique [53]. Les représentants de ce groupe sont des enzymes du type, AMP C, FOX, ACT, CMY.

La classe D regroupe les β -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de β -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les β -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactam [30].

Contrairement aux sérine- β -lactamases, les β -lactamases de la classe B nécessitent la présence d'un ou deux ions zinc pour être actives. Leur importance clinique est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des β -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- β -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam). A partir de la séquence des enzymes, cette classe est subdivisée en trois sous-classes, B1, B2, et B3 [36]. La production de ces enzymes par les bactéries pathogènes telles

K.pneumoniae, *E.coli*, *Serratia marcescens*, *P.aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chrysobacterium meningosepticum*, *A.baumannii*, rend difficile le choix d'une antibiothérapie efficace.

Chapitre III

LES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI :

1. Historique :

L'apparition des bêta-lactamases est très rapide, après le début de l'utilisation massive des bêta-lactamines dans les années 1940 :

- 1928 : découverte des β -lactamines par Flemming, qui met au point la pénicilline,
- 1940 : début de l'utilisation intensive de pénicilline,
- 1942 : 1^{ère} souche décrite de *S. aureus* résistante à la pénicilline (Pénicilline G) [37],
- 1960 : mise sur le marché de la méticilline,
- 1962 : isolement de la première souche de staphylocoque résistant à la méticilline (SARM) à Seattle (USA) [38],
- 1961 : mise sur le marché de l'ampicilline, active sur *E. coli*,
- 1963 : première souche d'*E. coli* productrice de pénicillinase mise en évidence à Londres (Royaume Uni) [40], Par la suite, on observe l'émergence de bêta-lactamases hydrolysant les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), les BLSE.
- 1983 : première description chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne [41], principalement chez des patients hospitalisés (type SHV),
- 1984 : première BLSE décrite en France chez *Klebsiella pneumoniae* [41].
- Dans les années suivantes, apparition chez toutes les espèces d'entérobactéries en rapport avec l'augmentation importante de l'utilisation des C3G, et avec la nature plasmidique des BLSE leur conférant une transmission d'espèce à espèce [40,41].

Depuis les années 2000, des β -lactamases hydrolysant quasiment l'ensemble des β -lactamines, y compris les carbapénèmes, les carbapénémases, ont été décrites [42]. Ces enzymes sont d'une grande diversité moléculaire [43] (types KPC, OXA, NDM essentiellement).

Les BLSE ont été décrites dans un second temps dans la communauté :

- 1992 : premières souches, dans deux hôpitaux de Buenos Aires en Argentine, de *S. typhimurium* communautaires productrices de type CTX-M chez des patients admis pour des tableaux de septicémies, d'entérites ou de méningites [44] ;
- 1996 : première description de BLSE communautaire en Europe, en Pologne (*E. coli* et *C. freundii*, producteurs de CTX-M-3) [45] ;
- étude sur les BLSE communautaires en France [46], sur une collection de 2599 entérobactéries décrites par ailleurs et recrutées par huit laboratoires privés du réseau Aquitaine, de janvier à mai 1999 : 1584 souches isolées en milieu communautaire parmi

lesquelles 5 souches (0,3%) produisaient une BLSE, toutes retrouvées dans des prélèvements urinaires ;

- en 2006, dans le même réseau [47], sur 6450 souches provenant d'urines en milieu communautaire, 72 (1,12%) étaient productrices de BLSE.

2. Définition et mécanisme d'action :

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation hydrolysant le pont amide du cycle β -lactame (correspondant à la structure de base des β -lactamines) pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif [48].

La différence majeure entre les β -lactamases et les PLP réside dans la vitesse à laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. En effet, si les PLP ne sont capables d'hydrolyser qu'un cycle β -lactame par heure (l'acylenzyme apparaît dans ce cas comme un intermédiaire stable).

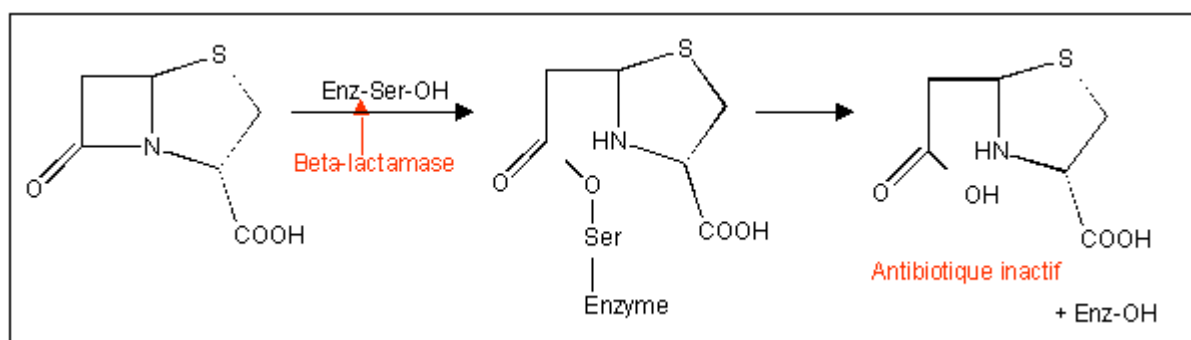


Figure 9 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame [48].

Les BLSE constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération de céphalosporines, à l'aztréonam (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques, et qui sont inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique [47].

La présence des BLSE a été décrite pour la première fois chez *Klebsiella ozaeniae*, en 1983 en République Fédérale d'Allemagne, puis en 1984 chez *K.pneumoniae* et *E.coli* en France et en Tunisie. Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et ceftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance préférentielle à la céfotaxime ou à la

ceftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres oxyimino- β -lactamines telles que la ceftriaxone et l'aztréonam. La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale [48,5].

L'utilisation des techniques moléculaires et la détermination des séquences peptidiques ont permis de démontrer que la plupart des BLSE dérivent des pénicillinases déjà connues (TEM-1, TEM-2, SHV-1) par substitution d'un ou plusieurs acides aminés qui leur permet d'hydrolyser oxyimino- β -lactamines et les monobactames [47].

Aujourd'hui on assiste à une émergence des BLSE non TEM et non SHV incluant les types CTX-M, PER, VEB, GES, et BESE [47]. Les BLSE sont à médiation plasmidique et appartiennent à la classe moléculaire A de Ambler et au groupe 2be de la classification de Bush-Jacoby-Medeiros à l'exception des BLSE OXA (Classe D de Ambler et 2d de Bush-Jacoby-Medeiros) [47].

De par leur propriété d'être inhibée par l'acide clavulanique elles se différencient des β -lactamases du groupe C produites par les bacilles à Gram négatif tel *Enterobacter* qui peuvent posséder un spectre élargi par surproduction mais qui sont résistantes à l'acide clavulanique et sont sensibles aux céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime, céfpirome) [50]. Elles diffèrent aussi des métallo- β -lactamases qui quoique hydrolysant toutes les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes) ne sont inhibées que par l'EDTA [51].

On distingue deux types de β -lactamases :

- les sérine- β -lactamases, utilisant un site actif à sérine (sérine 78) pour hydrolyser le cycle β -lactame.
- les métallo- β -lactamases, nécessitant des ions Zn^{2+} pour leur activité [47].

En ce qui concerne le support génétique des β -lactamases, celui-ci peut être :

- Chromosomique : elles sont alors soit constitutives, c'est-à-dire que le génome bactérien possède naturellement le gène d'expression de l'enzyme, soit inductibles ; l'expression du gène dépend alors de la présence ou non d'un inducteur dans le milieu (imipénème, céfoxitine, acide clavulanique...).
- Plasmidique : ce support de résistance a la possibilité d'être transmis à d'autres bactéries de façon stable.
- Intégrons

- Lié à l'intégration d'un transposon dans le génome bactérien qui est capable de promouvoir sa translocation d'un réplicon sur un autre ou en un autre site [47].

La capacité de résistance des bactéries vis-à-vis des β -lactamines repose sur deux actions distinctes. Tout d'abord, elles peuvent augmenter l'affinité des β -lactamases produites pour les β -lactamines, notamment par mutation chromosomique ou par acquisition plasmidique d'enzymes précédemment mutés. Les bactéries peuvent également augmenter la quantité d'enzymes synthétisés, de la même façon, soit par le biais d'une mutation chromosomique (touchant le plus souvent le système de régulation du gène), soit par voie plasmidique. Les enzymes sont alors appelés enzymes à haut niveau d'expression ou dérèprimés [47].

La résistance naturelle bactérienne vis-à-vis des β -lactamines est chromosomique, donc soit constitutive, soit inductible. Quant à la résistance acquise, elle fait intervenir soit un support chromosomique (mutation d'un gène de structure ou de régulation), soit un support plasmidique (transformation ou conjugaison), soit un transposon [47].

3. Classification :

De nombreuses classifications existent, prenant en compte comme critères :

- Les caractéristiques physiques
- Le phénotype : pénicillinases, céphalosporinases...
- La nature du site actif
- La séquence d'acides aminés
- L'origine (plasmidique ou chromosomique)
- La situation constitutive ou inductible

Aujourd'hui, les classifications d'Ambler et de Bush-Jacobi-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes [52].

3.1. Classification d'Ambler :

La première classification basée sur des critères scientifiques a été proposée en 1980 par Ambler. A cette époque fut décrite une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallo-enzymes (classe B). La classe C de céphalosporinases (sérine-enzymes) fut décrite en 1981 par Jaurin et Grunstrom, et la classe D, regroupant les « oxacillinases », fut dissociée des autres classes de sérineenzymes à la fin des années 80. Cette classification, en tenant compte des

analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique, est la plus utilisée en pratique médicale [52].

3.2. Classification de Bush-Jacobi-Medeiros :

Cette classification, plus fonctionnelle, a été proposée en 1989 et remise à jour en 1995. Elle reflète mieux le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition. Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale

- ❖ Le groupe 1 correspond à des céphalosporinases chromosomiques peu inhibées par l'acide clavulanique.
- ❖ Le groupe 2 est composé de pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases, et carbapénèmases chromosomiques ou codées par des plasmides et en général inhibées par l'acide clavulanique. Ce groupe est sub-divisé en 8 sous-groupes. En 1995, en raison de l'augmentation du nombre de dérivés de β -lactamases TEM et SHV, la classification initiale a été remise à jour et a classé ces dérivés dans différents groupes possédant le préfixe « 2b » : les groupes 2be (β -lactamases à spectre étendu), 2br (β -lactamases dérivant du groupe 2b avec une affinité réduite pour l'acide clavulanique) et le groupe 2f (carbapénèmases inhibées pas l'acide clavulanique et possédant un site actif à sérine).
- ❖ Le groupe 3 correspond à des métallo-enzymes en général retrouvés chez les *Pseudomonas* spp., *Bacteroides* spp. et *Serratia marcescens*, peu inhibés par l'acide clavulanique mais par l'EDTA in vitro.

Il existe enfin un quatrième groupe qui contient des enzymes divers non entièrement séquencés et non inhibés par l'acide clavulanique [52].

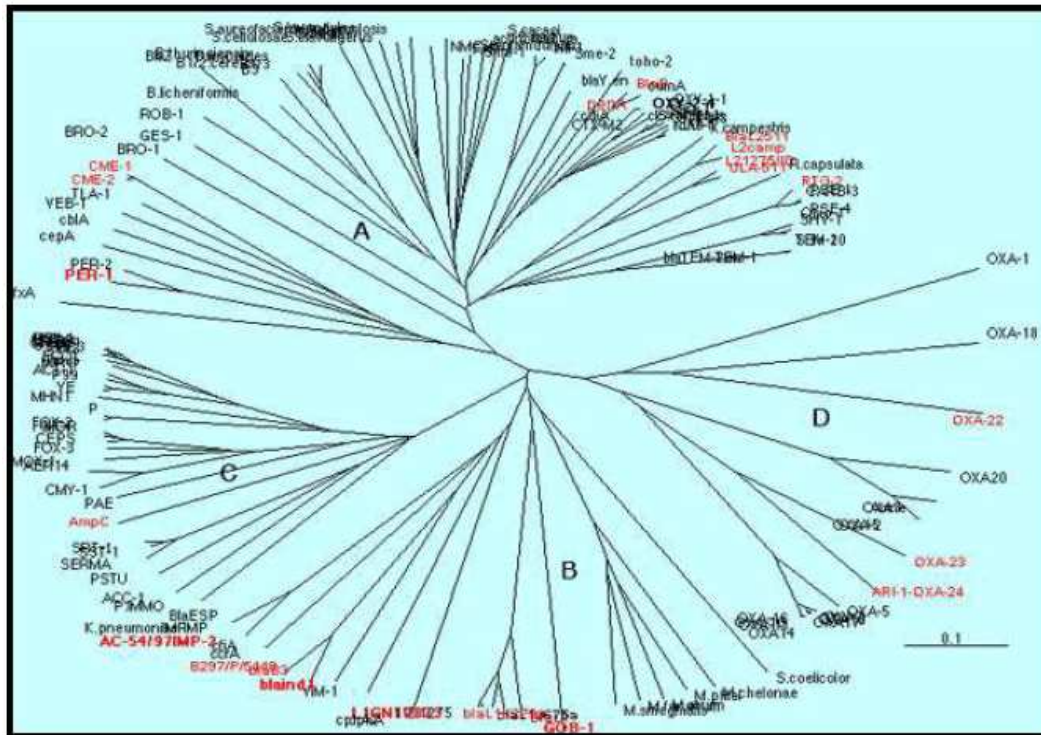


Figure 10 : les différentes classes de β -lactamases selon la classification d'Ambler. [52].

4. Les phénotypes de résistance des bacilles à Gram négatif aux β -lactamines : [53, 54, 55]

4.1. Résistances naturelles des entérobactéries aux β -lactamines : [53]

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, en fonction des résistances supplémentaires aux autres β -lactamines, elles sont classées en quatre groupes :

TABLEAU I : Résistances naturelles des entérobactéries aux β -lactamines.

Groupe de β -lactamines	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Principaux genres d'entérobactéries rencontrées en milieu hospitalier.	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Klebsiella Citrobacter koseri</i>	<i>Enterobacter Serratia Morganella Providencia Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia</i>
Aminopénicillines	S	R	R	R
Carboxypénicillines	S	R	S	R
Uréidopénicillines	S	I/R	S	I/R

C1G	S	S	R	R
C3G	S	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S
Mécanismes de résistances	Absence de β -lactamase	Pénicillinase à bas niveau	Céphalosporinase à bas niveau	Pénicillinase + céphalosporinase

I : Intermédiaire, S : Sensible, R : Résistant

- ❖ Les entérobactéries du groupe 1 : elles sont sensibles aux bêta-lactamines (exceptées les pénicillines G et M). Le phénotype sauvage est sensible aux aminopénicillines.
- ❖ Les entérobactéries du groupe 2 : elles produisent à bas niveau une pénicillinase naturelle et sont résistantes aux aminopénicillines, uréidopénicillines et carboxypénicillines.
- ❖ Les entérobactéries du groupe 3 : elles secrètent à bas niveau une céphalosporinase naturelle et sont résistantes aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération
- ❖ Les entérobactéries du groupe 4 : elles sont résistantes aux aminopénicillines, uréidopénicillines, carboxypénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération par l'action associée d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase naturelle produite à bas niveau.

4.2. Résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines :

Tableau II : Présentation des phénotypes de résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines :

Antibiotiques marqueurs	Pénicillinase bas niveau	Pénicillinase haut niveau	Pénicillinase résistante aux IbL(T.R.I.)	Céphalosporinase bas niveau (C.Ind.)	Céphalosporinase haut niveau (C.D.)	BLSE ¹
Amoxicilline AMX aminopénicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + Ac.clavulanique AMC aminopénicilline+IbL	S	I/R	R	R ²	R ²	R ³
Ticarcilline TIC	R	R	R	S	R	R

carboxypénicilline						
Méicillinam MEC aminidopénicilline	S	R	R	S	S	R
Céfaloine CF (C1G)	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime CTX (C3G)	S	S	S	S	R	R ou Synergie 4

I : Intermédiaire, S : Sensible, R : Résistant

1 : BLSE : β -lactamase à spectre élargie. | **2** : IbL : les inhibiteurs des β -lactamases n'inhibent pas les céphalosporinase (les céphalosporinases sont néanmoins des β -lactamases) | **3** : souche résistante parfois intermédiaire, dans tous les cas le diamètre d'inhibition pour l'AMC est supérieur à celui de l'AMX. | **4** : Certaines BLSE peuvent donner un profil intermédiaire ou sensible avec une C3G. La mise en évidence d'une synergie entre l'acide clavulanique (du disque AMC) et la C3G permettent de conclure à la présence d'une BLSE. Chez les entérobactéries on rencontre des BLSE chez *Klebsiella pneumoniae* et plus rarement chez *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*.

- Six phénotypes sont identifiés : [55]

- ❖ phénotype sensible (P.S.)

Les souches de ce phénotype sont sensibles aux bêta-lactamines. Il s'agit des entérobactéries du groupe 1.

- ❖ phénotype pénicillinase de bas niveau (P.B.N.)

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline et sensibles à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine et à la Ceftazidime.

- ❖ phénotype pénicillinase haut niveau (P.H.N.)

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine mais sont sensibles à la Céfazidime.

- ❖ phénotype pénicillinase résistante aux inhibiteurs des bêta-lactamases (T.R.I.)

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, l'association amoxicilline + acide clavulanique mais sont sensibles à la céfalotine et à la Ceftazidime

- ❖ Phénotype céphalosporinase inductible (C.Ind.)

Les souches de ce phénotype sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la céfalotine mais sont sensibles à la Ceftazidime et à la ticarcilline.

❖ phénotype céphalosporinase déréprimée (C.D.)

Les souches sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline, à la céfalotine et à la Ceftazidime mais elles sont sensibles au mécillinam.

❖ phénotype bêta-lactamase à spectre élargi (B.L.S.E.)

Les souches de ce phénotype sont résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline + l'acide clavulanique, à la céfalotine et à la Ceftazidime.

5. Production de β -lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables :

Le nombre des β -lactamases plasmidiques est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les β -lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique [49,58]. Il existe plusieurs centaines d'enzymes différentes chez les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, les β -lactamases sont excrétées alors que, chez les bactéries à Gram négatif, toutes les β -lactamases restent localisées à l'espace périplasmique [60].

Les pénicillinases se divisent en pénicillinases chromosomiques proprement dites et pénicillinases plasmidiques.

Les pénicillinases à large spectre entraînent la résistance à AMP- CARB-PIP et même parfois aux C1G. Elles sont fréquentes chez *K.pneumoniae* [49]. Les enzymes TRI entraînent la résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases. Elles existent chez *K.pneumoniae*.

Enfin les BLSE entraînant la résistance jusqu'au C3G et les souches restent sensibles à l'imipénème. *K.pneumoniae* est particulièrement intéressée par les BLSE.

Au laboratoire , cette production d'enzymes peut se traduire sur l'antibiogramme classique par l'apparition d'une image de synergie entre le disque chargé d'acide clavulanique (AMC, TCC) et les disques de céphalosporines de troisième génération, image en "bouchon de champagne" .



6. Production de céphalosporinases chromosomiques par des bactéries à Gram négatif :

Elles sont actives sur de nombreuses céphalosporines mais aussi sur les pénicillines à large spectre et sur l'aztréonam.

Pour les céphalosporinases elles sont naturellement chromosomiques chez certaines espèces d'entérobactéries, comme *Enterobacter* et *Serratia*, elles entraînent la résistance à aminopénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération. Mais ils sont sensibles à la plupart des céphalosporines de 2^{ème} et 3^{ème} génération, aux acyluréidopénicillines, monobactames, carbapénèmes [50,64]

- Les céphalosporinases inductibles :

La production de céphalosporinase chromosomique est souvent inductible. Des inducteurs (tels que les bêta-lactamines) peuvent lever l'action du répresseur chargé du contrôle du gène qui règle la production de cette céphalosporinase. Ce gène est alors activement transcrit et ainsi la production de l'enzyme augmente.

- Les céphalosporinases dérprimées

Certaines espèces peuvent perdre par mutation le contrôle de la production de céphalosporinase qui est alors dérprimée et donc produite abondamment.

Ces souches modifiées deviennent résistantes à toutes les bêta-lactamines sauf les amidinopénicillines et les carbapénèmes.

- Les céphalosporinases d'*Escherichia coli*

Chez 7% des souches, une céphalosporinase est mise en évidence. Cette céphalosporinase est due à l'augmentation par mutation de la production de la céphalosporinase chromosomique naturelle.

Elle détruit les pénicillines A, les céphalosporines de 1ère génération, la céfoxitine. Les autres céphalosporines de 2ème et de 3ème génération, l'aztréonam et les pénèmes restent actifs.

7. Différents types de BLSE :

7.1. Anciennes BLSE :

7.1.1. BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient) :

De nombreux dérivés de TEM-1/2 ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* [65, 66]. En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonellaenterica* et *E. coli* [67]. Les mutations responsables de l'élargissement de spectre ont généralement lieu au niveau de 4 «hot spots» de la protéine (positions 104, 164, 238 et 240) [68]. A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux IβL, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) [65].

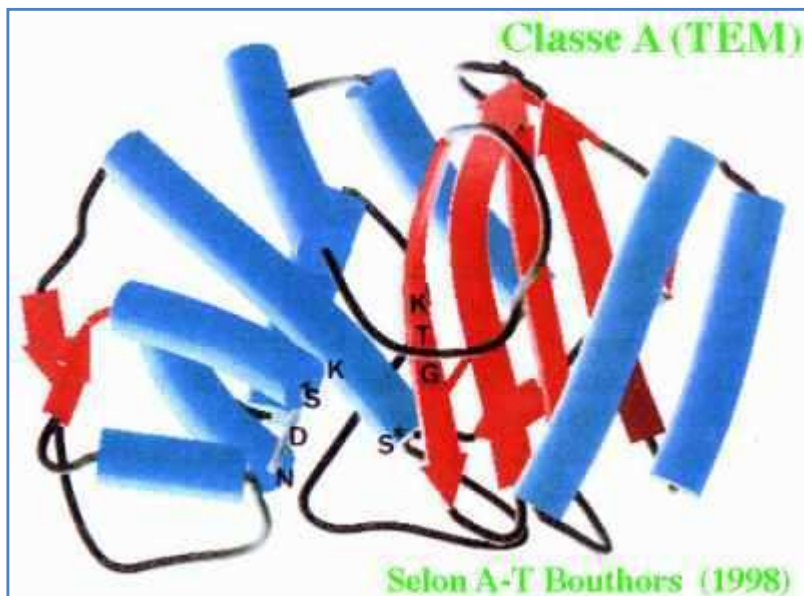


Figure 11: Représentation en 3D d'une β -lactamase de type TEM [65].

7.1.2. BLSE de type SHV (Sulphydryl variable) :

La majorité des dérivés de SHV-1 ont un phénotype de BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe [64]. Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. [65, 66]. Comme les dérivés de TEM, les mutations dans SHV-1 (68% d'identité avec TEM-1) ont lieu classiquement au niveau de quelques positions (notamment 238 et 240) [68]. Enfin, le gène codant pour SHV-12 a été décrit en association avec le déterminant plasmidique de résistance aux quinolones, QnrB [67].

7.2. Nouvelles BLSE :

7.2.1. BLSE de type CTX-M (Céfotaximase -Munich) :

Ces enzymes «émergentes» pourraient représenter très prochainement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 [49, 50, 64, 65]. Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases [64].

En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au céfotaxime (CMI > 64 $\mu\text{g/mL}$) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 $\mu\text{g/mL}$), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables. Au niveau structural, les CTX-M ne sont pas proches des β -

lactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité) [64]. A ce jour, de nombreux variants de CTX-M ont été décrits (>50), et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45 [66].

Les enzymes Toho-1/2, décrites au Japon, sont très proches structuralement des CTX-M et sont donc classées parmi celles-ci [64]. A noter que certaines variantes (ex. CTX-M-15, CTX-M-32) avec une activité de ceftazidimase élevée (CMI > 256 µg/mL) ont été décrits (mutation ponctuelle en position 240) [64, 66].

Les progéniteurs des CTX-M ont été identifiés sur le chromosome de *Kluyvera* spp. qui sont des entérobactéries non pathogènes environnementales. En effet, les progéniteurs des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* et *K. georgiana*, tandis que les sources des CTX-M des groupes 25 et 45 restent inconnues [67].

Depuis leurs progéniteurs, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles type séquence d'insertion (ex. *ISEcp1*, *ISCR1*) ou à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes [64, 65, 66]. Les souches productrices de CTX-M ont été initialement rapportées de façon sporadique à la fin des années 80 au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2) [65].

7.2.2. Distribution des CTX-M :

Dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de CTX-M (*S. enterica*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *E. aerogenes*) a été décrite en Argentine et dans les pays voisins, impliquant pour la plupart les CTX-M du groupe 2 [64, 65]. En 15 ans, la diffusion mondiale des BLSE de type CTX-M chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie CTX-M» [67].

Les études épidémiologiques récentes rapportent que la situation est endémique dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud avec de forts taux de prévalence de CTX-M parmi les souches productrices de BLSE : *E. coli* (de 30 à 90%) et de *K. pneumoniae* (de 10 à 60 %) [65, 67]. A noter que quelques CTX-M sont retrouvées spécifiquement dans certains pays (comme CTX-M-9 et CTX-M-14 en Espagne, CTX-M-1 en Italie ou CTX-M-2 en

Amérique du Sud, au Japon et en Israël) tandis que CTX-M-15 est mondialement distribuée [67]. En Espagne, la prévalence des CTX-M parmi les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* productrices de BLSE était respectivement de 52,3 % et 12,5 % tandis qu'en Italie, les taux respectifs étaient de 54,8 % et 12,3 % [66]. La large diffusion des CTX-M a changé considérablement l'épidémiologie des BLSE à l'hôpital mais aussi celle dans la communauté avec l'émergence de souches productrices de BLSE, principalement des souches de *E. coli* productrices de CTX-M (notamment CTX-M-15) [63, 66]. De plus, le portage digestif de souches productrices de BLSE est devenu non négligeable avec un réservoir de BLSE animal important [65]. Dans une étude récente espagnole, les taux de portage de souches de *E. coli* productrices de BLSE étaient de 11,8 % chez les patients hospitalisés et de 5,5 % chez les patients de ville avec 42 % et 69 % de CTX-M, respectivement [65].

7.2.3. Co-résistance et CTX-M :

Comme pour les plasmides TEM/SHV, les plasmides CTX-M portent souvent d'autres gènes de résistance (notamment aux aminosides, aux tétracyclines, aux sulfamides et au triméthoprim) d'où la notion de co-résistance, co-expression et co-sélection [67]. De plus, la plupart des souches productrices de CTX-M sont résistantes aux fluoroquinolones. Cette résistance, principalement due aux modifications des topoisomérases, pourrait aussi être expliquée par la diffusion de déterminants plasmidiques associés aux CTX-M, comme Qnr et AAC (6')-Ib-cr, mais l'impact clinique reste à évaluer [67]. Enfin, à noter que les BLSE de type CTX-M peuvent être associées à d'autres β -lactamases, comme CTX-M-15 avec l'oxacillinase OXA-1 ou des céphalosporinases plasmidiques [62, 65].

7.2.3. BLSE de type PER (*Pseudomonas* extended resistance).

7.2.4. BLSE de type VEB (Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase).

7.2.5. BLSE de type GES (Guyana Extended-Spectrum Beta-lactamase).

7.2.6. BLSE de type OXA (Oxacillinase).

8. Les mutations ponctuelles (TEM et SHV) :

8.1. Anciennes : mutation de TEM et SHV :

L'apparition des BLSE s'explique initialement par la mutation des gènes plasmidiques de TEM et SHV. En effet, une seule mutation sur le plasmide de TEM ou SHV peut provoquer une

modification du site actif de l'enzyme et donc une modulation de l'activité pouvant s'exprimer de façon variable vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération [42].

- **Mutation de TEM :**

Cette substitution en acide aminé ne concerne qu'un nombre restreint de position mais certaines sont particulièrement importantes. Il a été montré que, pour TEM, les acides aminés les plus mutés sont en position 104, 164, 238 et 240. Les acides substitués sont la lysine, la sérine, la leucine et l'histidine [42].

Cela a une importance car la mutation du gène entraînant une variation de la structure protéique de l'enzyme synthétisé, l'affinité de l'enzyme pour la β -lactamine peut en être modifiée. Par exemple, si l'acide aminé en position 238 devient une sérine, l'interaction entre le $-NH_3$ de la sérine et le groupement oxy-imino des C3G (surtout ceftriazone, cefotaxime et ceftazidime) est augmentée par une meilleure stabilité de la β -lactamine dans le site actif de l'enzyme. Les enzymes obtenus sont par exemple les TEM-3 et suivantes qui vont hydrolyser les C3G. Les mutations ne concernent jamais la sérine 70 du site actif [42].

Parfois, la mutation de l'acide aminé sur TEM peut entraîner une baisse de l'affinité de la β -lactamase pour l'ensemble des β -lactamines et en particulier pour les inhibiteurs (figure 13). Ces enzymes de classe A sont appelés TRI (figure 12) pour TEM résistant aux inhibiteurs. Ils ont une faible activité en entraînant qu'une faible augmentation des CMI.

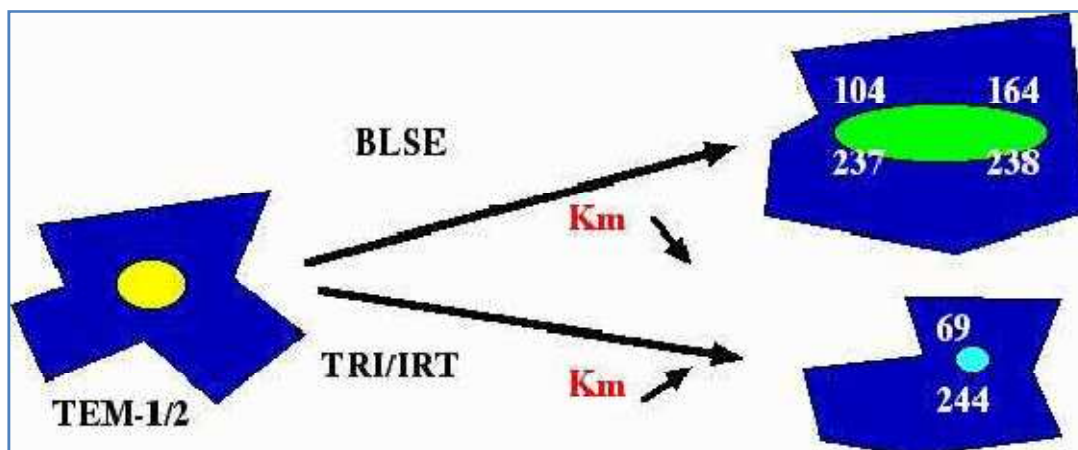


Figure 12 : Schéma de l'évolution des TEM-1/2 [42].

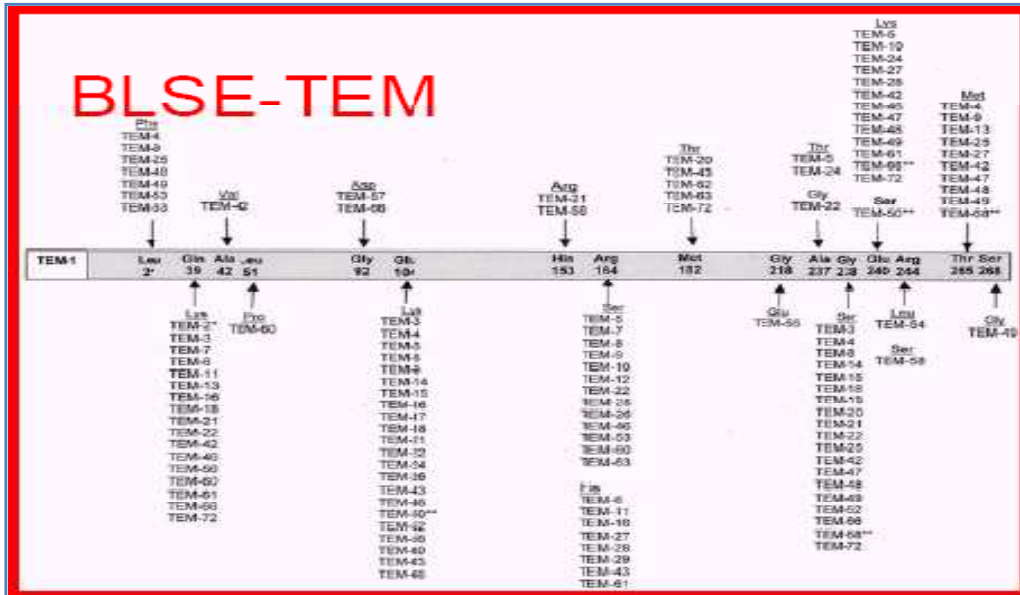


Figure13 : Schéma de BLSE type TEM en fonction de la mutation plasmidique [42].

• Mutation de SHV :

Par rapport aux β-lactamases de type TEM, il existe relativement moins de mutants SHV avec un nombre de mutations ponctuelles également réduit (figure 14). La position la plus substituée est la 238 avec par exemple la SHV-2 sur laquelle la glycine est substituée par une serine. Ainsi, en fonction de l'acide aminé substitué, la β-lactamase développera une meilleure affinité pour l'une des C3G [42].

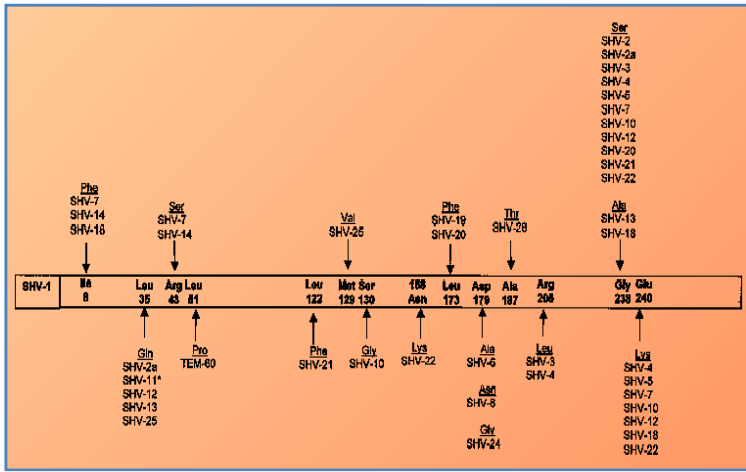


Figure 14: Schéma de BLSE type SHV en fonction de la mutation plasmidique [42].

Partie Expérimentale

I. Cadre d'étude :

Cette étude s'est réalisée sur une période de deux mois et demi, au laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Benflis Touhami de Batna et la Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela.

A. 1 Le CHU de Batna :

Le CHU de Batna est composé de différents services /

- Le service de pharmacie,
- Les services : les laboratoires [de Microbiologie, de Biochimie et de Parasitologie], le service de Radiologie, Hématologie, Immunologie, Toxicologie, Histologie, CTS (Centre de Transfusion Sanguin) + La Banque de sang, Pédiatrie, Cardiologie, Ophtalmologie.
- I. Il se trouve au terrain principal du service : Néphrologie, Hématologie, Réanimation médicale, Biochimie, Immunologie, Toxicologie, CTS + Banque de sang, Microbiologie,
- II. 1^{er} étage : Ophtalmologie, Traumatologie,
- III. 2^{ème} étage : Chirurgie (Femme, Homme, Infantile et Urologie),
- IV. 3^{ème} étage : Pédiatrie, Endocrinologie, Cardiologie,
- V. 4^{ème} étage : Médecine (femme et Homme), Neurologie.

A. 2 Le laboratoire de microbiologie :

a) Situation géographique :

Le laboratoire de microbiologie du CHU Benflis Touhami de Batna se trouve au terrain principal de service.

Les locaux sont composés :

- D'un bureau du chef de service (médecin chef),
- D'une secrétaire et surveillante de service,
- D'un bureau des maîtres assistants + bureau des résidents,
- D'une salle de préparation des milieux de cultures,
- D'une salle de manipulation qui comporte 4 paillasse :
 - ❖ Une paillasse pour l'examen cyto bactériologique des urines,
 - ❖ Une paillasse pour l'examen d'hémoculture,
 - ❖ Une paillasse pour les prélèvements génitaux,
 - ❖ Une paillasse pour l'antibiogramme,
 - ❖ Unité de Tuberculose,

❖ Unité d'urgences bactériologiques.

b) Les personnels :

Le personnel est composé :

- D'un professeur,
- 06 maîtres assistants,
- 03 spécialistes,
- 07 résidants,
- 01 surveillant médical (chef d'équipe),
- 01 Secrétaire,
- 20 techniciens.

c) La mission du laboratoire :

Le laboratoire de Microbiologie a pour vocation diagnostic et recherche. En effet, comme tous les laboratoires de Microbiologie, le laboratoire aide les cliniciens dans l'établissement d'un diagnostic rapide et efficace des maladies. Il vient également, dans l'étude de la sensibilité des bactéries en facilitant les choix des molécules d'antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses. Le laboratoire de Microbiologie intervient en outre dans la surveillance épidémiologique des maladies épidémiques. Le laboratoire du CHU de Batna fait également des études de recherche et participe à la formation des étudiants en Microbiologie, Médecine, Pharmacie et des étudiants des écoles de formation paramédicale.

B. La Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela :

La Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela est composé de différents services :

- Le service de pharmacie,
- Les services : le laboratoire [de Microbiologie, de Biochimie et de Parasitologie], le service de Radiologie, Pédiatrie, Cardiologie, Ophtalmologie, Gynécologie, le service d'urgence,

VI. Il se trouve au terrain principal du service : Ophtalmologie, le service de Radiologie, le service d'urgence, de Cardiologiste de Pédiatrie.

VII. 1^{er} étage : Chirurgie (Femme, Homme),

VIII. 2^{ème} étage : le service de Gynécologie

IX.

C. Le laboratoire de microbiologie :

d) Situation géographique :

Le laboratoire de microbiologie de la Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela se trouve au terrain principal de la clinique.

Les locaux sont composés :

- D'un bureau du chef de service (médecin chef),
- D'une chambre de prélèvements,
- D'une salle de microbiologie générale qui comporte les paillasses suivantes :
 - ❖ l'examen cytobactériologique des urines,
 - ❖ l'examen d'hémoculture,
 - ❖ les prélèvements génitaux,
 - ❖ l'antibiogramme,
 - ❖ Tuberculose,
 - ❖ Urgences bactériologiques.

e) **Les personnels :**

Le personnel est composé :

- D'un professeur,
- 01 surveillant médical (chef d'équipe),
- 06 techniciens.

f) **La mission du laboratoire :**

Le laboratoire de Microbiologie a pour vocation diagnostic et recherche. En effet, comme tous les laboratoires de Microbiologie, le laboratoire aide les cliniciens dans l'établissement d'un diagnostic rapide et efficace des maladies. Il vient également, dans l'étude de la sensibilité des bactéries en facilitant les choix des molécules d'antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses. Le laboratoire de Microbiologie intervient en outre dans la surveillance épidémiologique des maladies épidémiques. Le laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela fait également des études de recherche et participe à la formation des étudiants en Microbiologie et des étudiants des écoles de formation paramédicale.

II. Matériels et méthodes :

II.1 Matériels : (Voir annexe1).

II. 2 Souches bactériennes (prélèvements) :

Les souches d'entérobactéries productrices de BLSE de notre étude, ont été isolées à partir de divers prélèvements qui ont été analysés dans le laboratoire de microbiologie du CHU Batna tels que les urines, pus, hémocultures, sondes urinaires, sécrétions bronchiques...etc.

Ces prélèvements provenaient de malades hospitalisés et aussi de patients externes.

II.3 Période d'étude:

15 Mars 2013 – 31 Mai 2013.

II.4 Nature des échantillons :

- ECBU (Etude Cytobactériologique des Urines).
- ECB de pus.
- Sang (hémoculture).
- Liquide céphalo-rachidien (ECB de LCR) et divers prélèvementsetc.

II.7 Méthode d'étude :

- ❖ Méthodes d'isolement à partir des produits pathologiques :

Le traitement des produits pathologiques diffère en fonction de la nature du prélèvement.

Prélèvement :

- Urine :

ECBU (examen cytotbactériologique des urines) permet de faire le diagnostic d'une infection urinaire. Le prélèvement s'effectue en recueillant les premières urines du matin en milieu de jet après le nettoyage du méat urinaire avec une solution antiseptique.

- Sang (hémoculture) :

L'hémoculture consiste à mettre en culture des ballons contenant un milieu stérile, du sang du malade, à la recherche de septicémie.

Le prélèvement doit être effectué avant tout traitement antibiotique ou après une fenêtre thérapeutique au moment des pics fébriles ou de frisson.

Le sang est prélevé par ponction veineuse et l'ensemencement des flacons se fait au lit du malade avec une quantité de sang égale au 1/10^e du volume du milieu de culture contenu dans le ballon.

➤ Liquide céphalo-rachidien (LCR) :

L'examen cyto bactériologique du LCR permet de faire le diagnostic des méningites purulentes grâce à l'étude du LCR obtenu par ponction lombaire.

➤ Pus et divers :

Le pus peut avoir diverses origines et les divers prélèvements peuvent être :

- Liquides d'épanchement (liquide d'ascite, pleural, articulaire, péricardique, péritonéal)
- Prélèvement des lésions superficielles de la peau et des muqueuses
- Le prélèvement se fait par ponction ou écouvillonnage.

Le prélèvement est une étape essentielle du diagnostic car c'est de sa qualité que dépend l'analyse bactériologique. Il nécessite des conditions d'asepsie et de stérilité, doit se faire en absence d'antibiothérapie, à défaut, ouvrir une fenêtre thérapeutique.

a) Examen cyto bactériologique :

➤ Examen macroscopique :

A ce stade on note, l'aspect macroscopique du produit pathologique.

➤ Examen microscopique :

A l'aide d'un microscope optique il y'a tout d'abord :

Observation microscopique à l'état frais ($\times 40$, $\times 100$) : permet de déterminer la morphologie, la mobilité, le regroupement des colonies.

b) Observation microscopique avec coloration de Gram :

A partir du prélèvement traité si nécessaire, de réaliser un frottis qui était coloré au Gram pour la bactériologie. L'examen microscopique à l'objectif ($\times 100$) permettait d'apprécier l'aspect de la flore. une grande importance était accordée à ce Gram direct, car il permettait de faire un choix judicieux des milieux à ensemer. (Voir Annexe 2) [68].

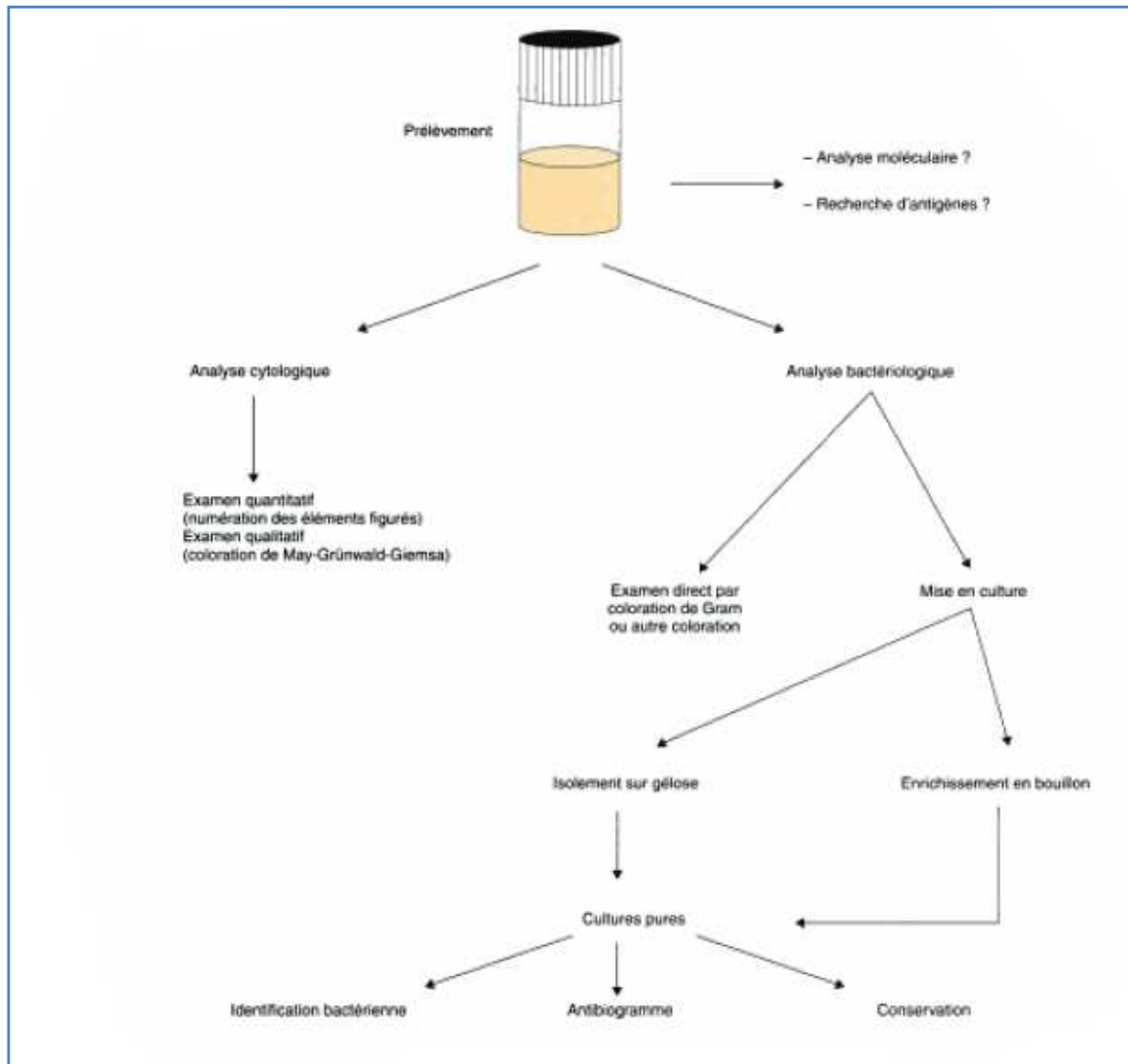


Figure15 : Schéma de démarche de l'analyse bactériologique [68].

II.8 Méthodes d'isolement et d'identification à partir des prélèvements :

a) Méthode d'isolement :

L'isolement a été réalisé par mise en culture des prélèvements sur milieu gélosé de Mac Conkey, qui par sa teneur en cristal violet laisse pousser les bacilles à Gram négatif, et inhibe les autres bactéries.

b) Méthode d'identification des Entérobactéries :

- Galerie classique et API20E : pour les Bacilles à Gram négatif fermentaires type entérobactéries (Voir Annexe 4).
- Milieu Mac Conkey ou BCP (Voir Annexe 4).

II.9 Détermination de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques (l'antibiogramme) :

(Voir annexe 5)

II.10 Phénotypes de résistance aux β -lactamines : le phénotype recherché est le BLSE (β -lactamases à spectre étendu) :

Enzymes à médiation plasmidique, conférant une résistance à toutes les β -lactamines et n'épargnent que les C2G de type céphamycine comme la FOX, ainsi que L'imipénème [69].

10.1. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi :

Selon les recommandations du CLSI (M100-S21), la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des entérobactéries aux céphalosporines n'est plus obligatoire.

La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- Céfotaxime (CTX a 27mm),
- Céfotaxime (CTX a 27mm),
- Céftriaxone (CRO a 25mm),
- Aztréonam (ATM a 27mm)[69].

10.2. Méthodes de détection de la BLSE :

1. Test de synergie :

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (Acide clavulanique, Sulbactam et Tazobactam) [69].

2. Technique :

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'Amoxicilline+Acide clavulanique (AMC 20/10 μ g) a 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Céfotaxime : CTX 30 μ g ou Céftriaxone : CRO 30 μ g). Incuber 18H à 35°C.

Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT, ...) :

Le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et ATM en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents (Céfotaximase ou Céftazidimase ...) [69].

3. Lecture

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques (figure 16) :

- AMC et CTX
- AMC et CAZ
- AMC et ATM.



Figure16 : Souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE (Bouchon de champagne).

4. Recommandation

Chez *P.mirabilis*, *P.penneri*, *P.vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, les BLSE s'expriment à bas niveau ; dans ce cas, le test de synergie est optimisé en disposant les disques à une distance de 40 à 45mm au lieu de 30mm.

5. Absence de synergie :

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G [69].

Elle peut être due à :

- 1) La synthèse d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM)
- 2) L'association de plusieurs mécanismes : BLSE + Case hyperproduite (entérobactérie).
- 3) La recherche de CMT : se fera en rapprochant les disques CTX- AMC de 20mm et 25mm au lieu de 30mm.
- 4) La détection des BLSE chez les souches hyper productrices de Case est facilitée par :
 - La recherche d'une **synergie** entre AMC et Céfepime (CFP 30µg) ou Céfpirome (CPO 30µg SFM), car ce sont des molécules stables à l'action de la Case hyperproduite (recommandations du CA-SFM-2011).

Ou

- L'inactivation de la Case en incluant de la Cloxacilline (0,25mg/ml - 0,30mg/ml) dans la gélose pour les entérobactéries du groupe 3 (Voir test à la Cloxacilline).
- 5) L'usage de disque ou de bandelette E-test combinant une C3G et un inhibiteur enzymatique [76].



Figure 17 : Souche d'*Escherichia coli* ne produit pas de β -lactamase à spectre élargi (l'absence d'une image de synergie).

6) Risque d'erreur d'interprétation :

Chez *Klebsiella oxytoca*, *P.vulgaris*, *P.penneri*, *Citrobacter koseri*, le test de synergie est positif avec Aztreonam et / ou Céftriaxone, mais reste négatif avec Céftrizidime dont l'activité est conservée, signe d'hyperproduction de β -lactamase naturelle chromosomique ou Aztreonamase.

10.3. Tests complémentaires :

➤ Test du double disque (test espagnol)

La détection de la β -lactamase à spectre élargi (étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test plus sensible consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G.

La technique est la suivante :

A partir d'une culture de 18h une suspension est préparée avec une opacité égale à 0.5 Mc Farland, une gélose Mueller-Hinton estensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques sont déposés, un disque AMC et un disque de C3G (CTX ou CAZ). On laisse diffuser à température ambiante pendant une heure, puis le disque AMC est ôté et remplacé par un disque de C3G (CTX ou CAZ). Les boîtes sont incubées 18h à 37°C.

Le test est considéré positif, si le diamètre de la zone d'inhibition du disque de C3G est inférieur de 4 à 5 mm, comparé à celui observé autour du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC [69].

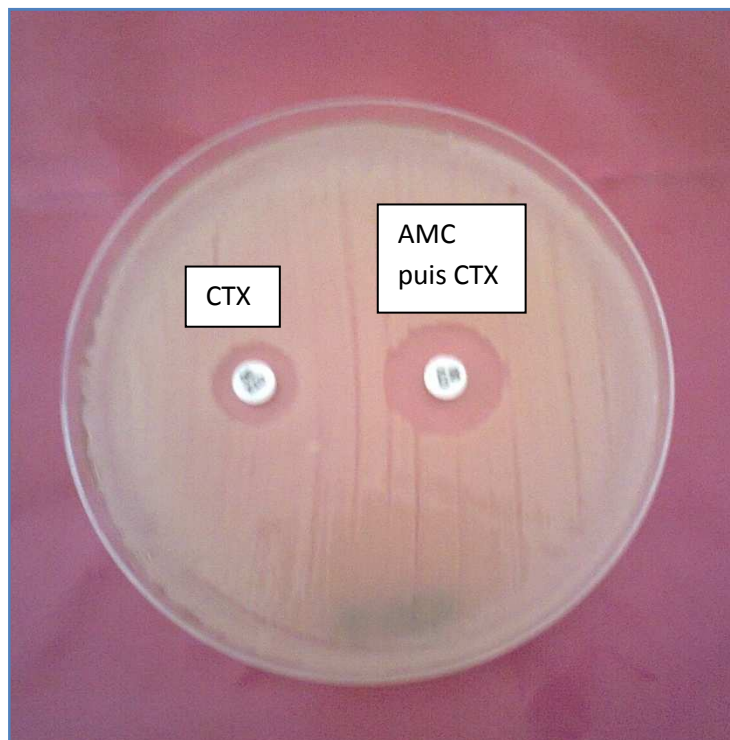


Figure 18 : Test du double disque (test espagnol) pour la détection des BLSE.

➤ **Test du rapprochement des disques :**

Lorsqu'un second mécanisme de résistance est susceptible de masquer la présence de l'image de synergie, il est possible de retrouver cette dernière en rapprochant les disques de C3G ou de l'aztréonam (15 à 20) du disque de l'AMC. La préparation de l'inoculum et l'ensemencement se font de la même manière que le test de synergie, le disque AMC est placé au milieu de la boîte de Pétri [57].

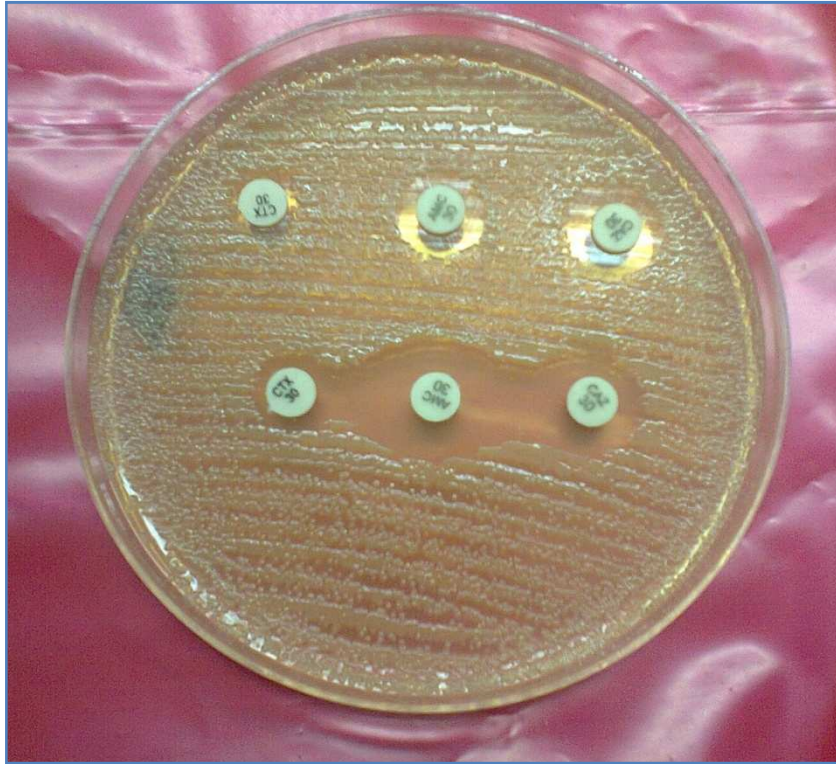


Figure19 : Images de synergie entre AMC et β -lactamines (CAZ, CTX).

➤ **Test à la cloxacilline :**

Principe:

Le test cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée.

La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les céphalosporinases de la classe A d'Amber [70] tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité des β -lactamases et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée.

Méthode:

La concentration de cloxacilline est de 0,25 mg/ml, il faut dissoudre 25 mg de cloxacilline dans 10ml d'eau distillée. Mettre 2 ml de cette concentration avec 18 ml du milieu Mueller-Hinton.

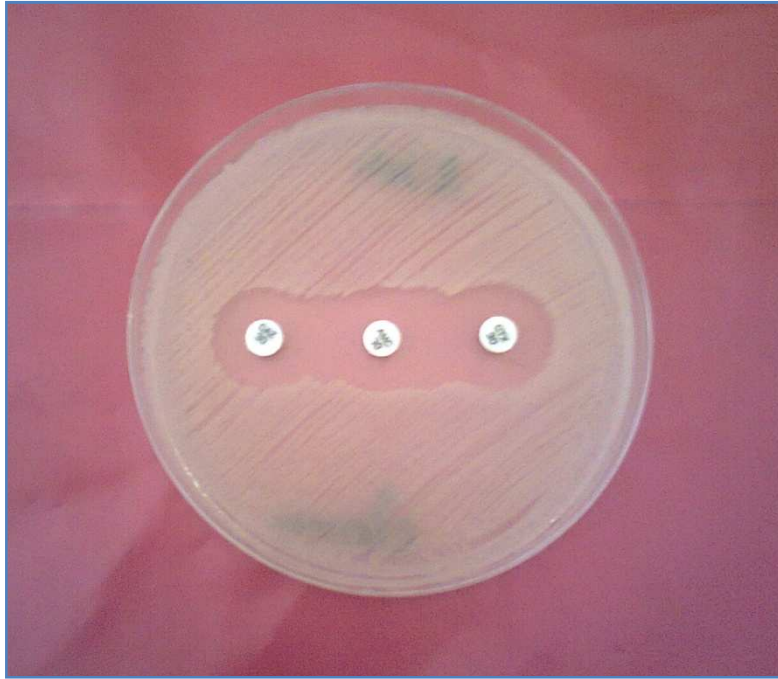


Figure 20 : Test à la cloxacilline.

10.4.Détermination du phénotype de résistance des BLSE :

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme, elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en bouchon de champagne qui peut apparaître, sur gélose, entre les disques de bêta-lactamines utilisés [70].

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivants : AMC, CAZ, CTX, CRO et ATM sont placés sur la gélose Mueller-Hinton selon le schéma ci-dessous. La distance entre deux disques est de 3 cm. L'incubation des boites se fait 18 à 24h à 37°C.

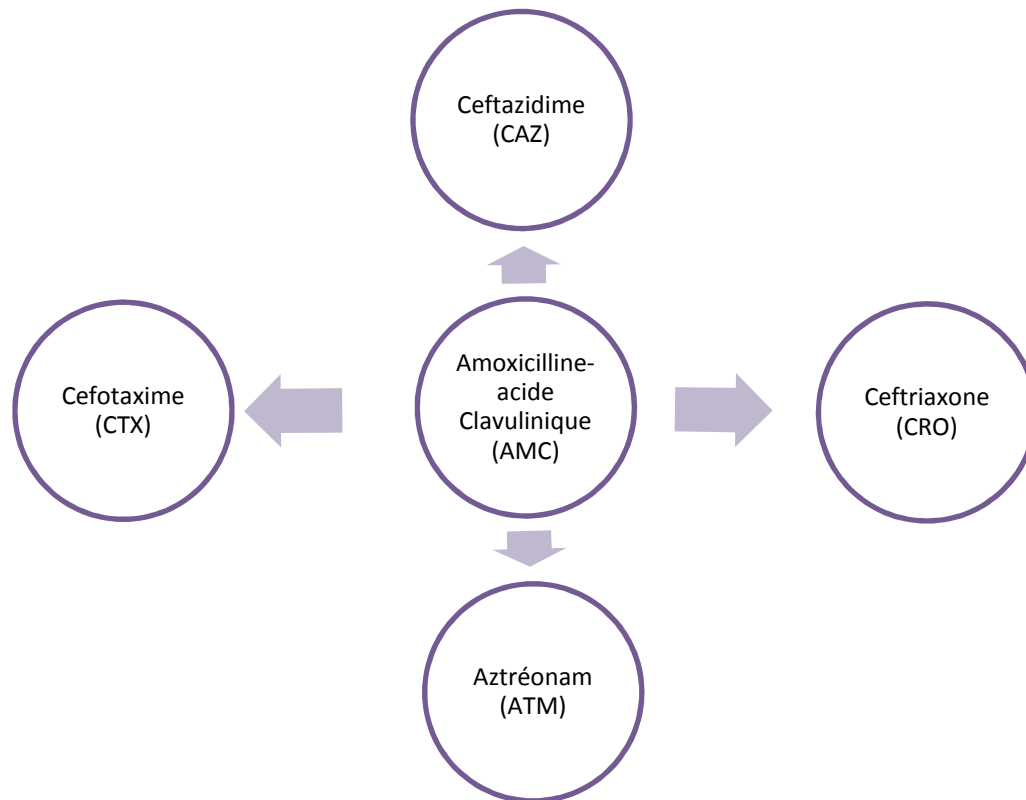


Figure 21 : Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE.

- **Les phénotypes rares :**

Sont la céphalosporinase plasmidique (aminopénicillines, AMC, et C1G résistants), céphalosporinase de haut niveau (AMC, cefoxitine et C3G résistants) voire phénotype résistant à l'imipénème [70].

Résultats

VIII. Résultats :

Au cours des ces (3 mois), 53 souches sécrétrices de **BLSE** appartenant à 04 espèces d'Entérobactéries ont été isolées au laboratoire de Microbiologie du CHU de Batna et laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela. Ces souches sont réparties en fonction de la pathologie, du service, de l'âge, du sexe, de wilaya. Leur comportement vis-à-vis d'autres antibiotiques à été également étudié.

1) Répartition des Entérobactéries par espèce dominante.

Tableau III : Répartition des Entérobactéries (N= 75).

Espèces bactériennes	Effectifs	Fréquence
<i>Klebsiella spp</i>	35	47%
<i>Escherichia coli</i>	20	27%
<i>Enterobacter spp</i>	16	21%
<i>Providencia spp</i>	4	5%
Total	75	100%

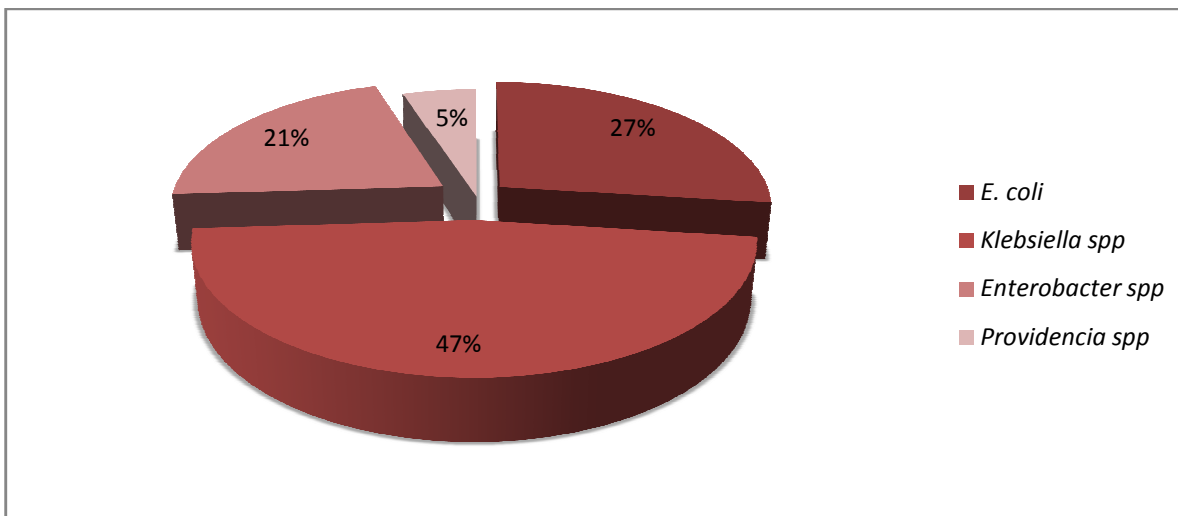


Figure 22: Répartition des Entérobactéries.

Commentaires :

L'espèce bactérienne *Klebsiella spp* prédomine (47%) suivi d'*Escherichia coli* (27%), *Enterobacte spp* (21%), *Providencia* (5%).

2) Répartition des BLSE chez les Entérobactéries. [N= 53] :

Nombre des Entérobactéries : N= 75

Tableau IV : Répartition des BLSE chez les Entérobactéries.

BLSE chez les Entérobactéries	Effectifs	Pourcentage
BLSE positive	53	71%
BLSE négative	22	29%
TOTAL	75	100%

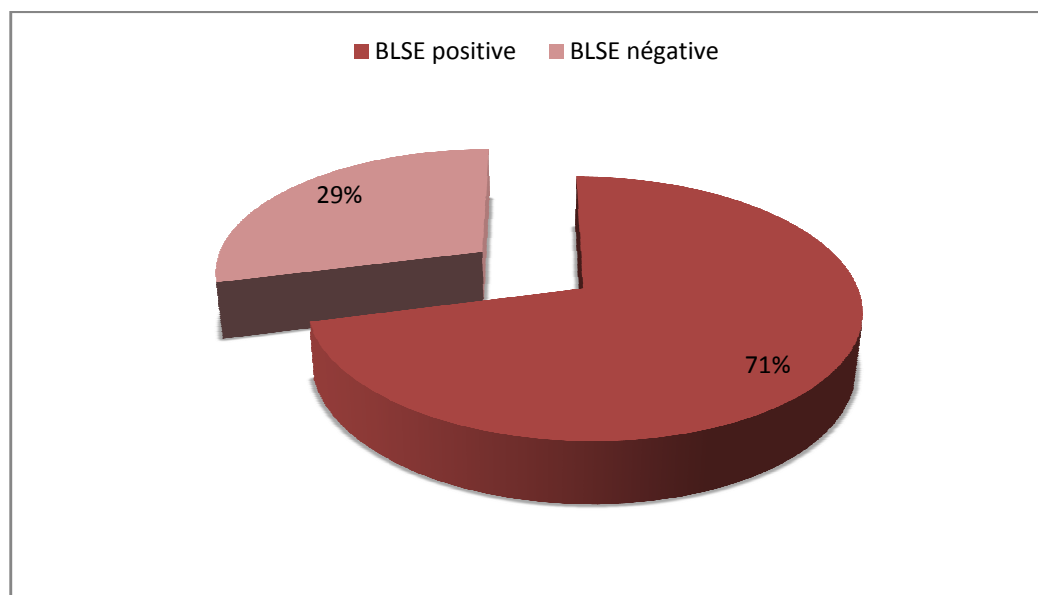


Figure23 : Répartition des BLSE chez les Entérobactéries.

Commentaires :

Parmi les 75 Entérobactéries de l'étude, 53 produisent une β -lactamases à spectre élargi (BLSE), soit (71%).

3) Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne :

Tableau V : Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne isolée.

Espèces bactériennes	Effectifs	Pourcentage
<i>Klebsiella spp</i>	25	47%
<i>Escherichia coli</i>	15	28%
<i>Enterobacter spp</i>	12	23%
<i>Providencia spp</i>	1	2%

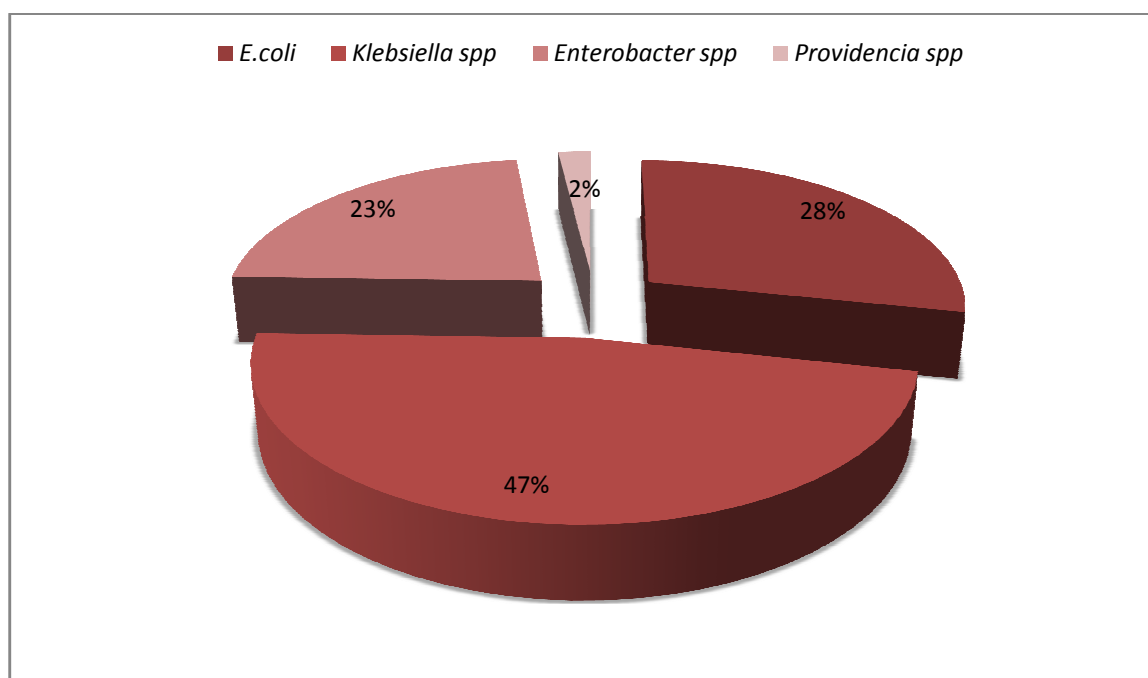


Figure 24 : Répartition des BLSE positives selon l'espèce bactérienne.

Commentaires :

Klebsiella spp est l'espèce bactérienne qui produit le plus de β -lactamases à spectre élargi (47%) suivi d'*Escherichia coli* (28%), *Enterobacter spp* (23%) et en dernière position vient *Providencia* (2%).

4) Répartition des BLSE positives selon l'origine géographique d'isolement :

Tableau VI : Répartition des BLSE positives selon l'origine géographique d'isolement.

Espèces bactériennes	L'origine		Total
	Externes	hospitalier	
<i>Klebsiella spp</i>	2	23	25
<i>Escherichia coli</i>	7	8	15
<i>Enterobacter spp</i>	4	8	12
<i>Providencia spp</i>	0	1	1
Total	13	40	53
Pourcentage	25%	75%	100%

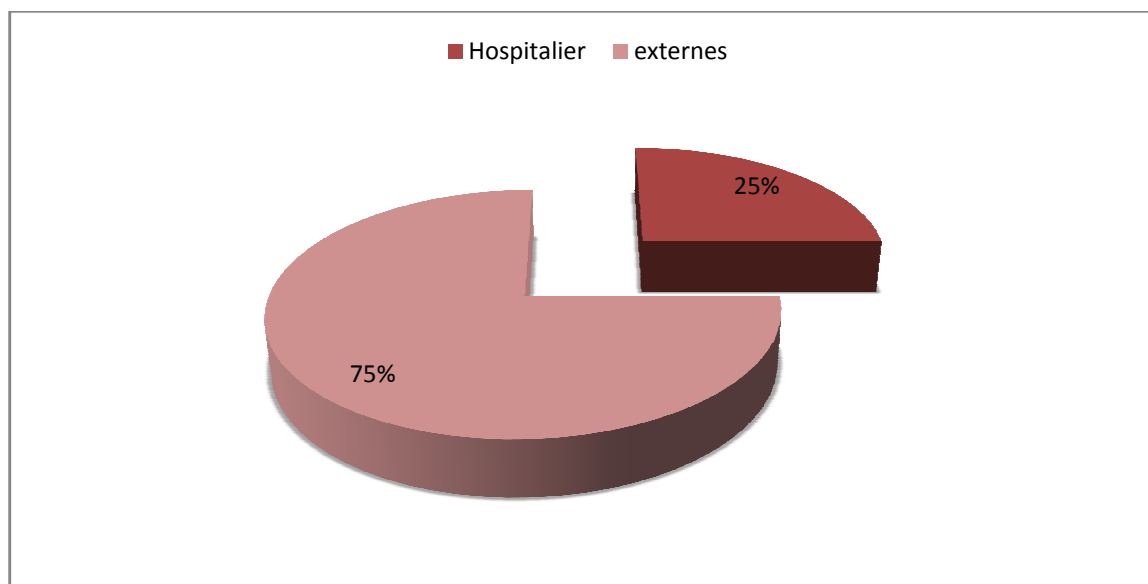


Figure 25: Répartition des BLSE positives selon l'origine géographique d'isolement.

Commentaires :

On note que 75% des souches sont isolées à l'hôpital contre 25% externes.

5) Répartition des BLSE positives selon le site du prélèvement:

Tableau VII : Répartition des BLSE positives selon la nature du prélèvement.

Prélèvements	Effectifs	Pourcentage
Urines	12	22%
Pus	29	56%
Autres	12	22%
Total	53	100%

Autres (hémoculture, sonde urinaire, ECB de LCR).

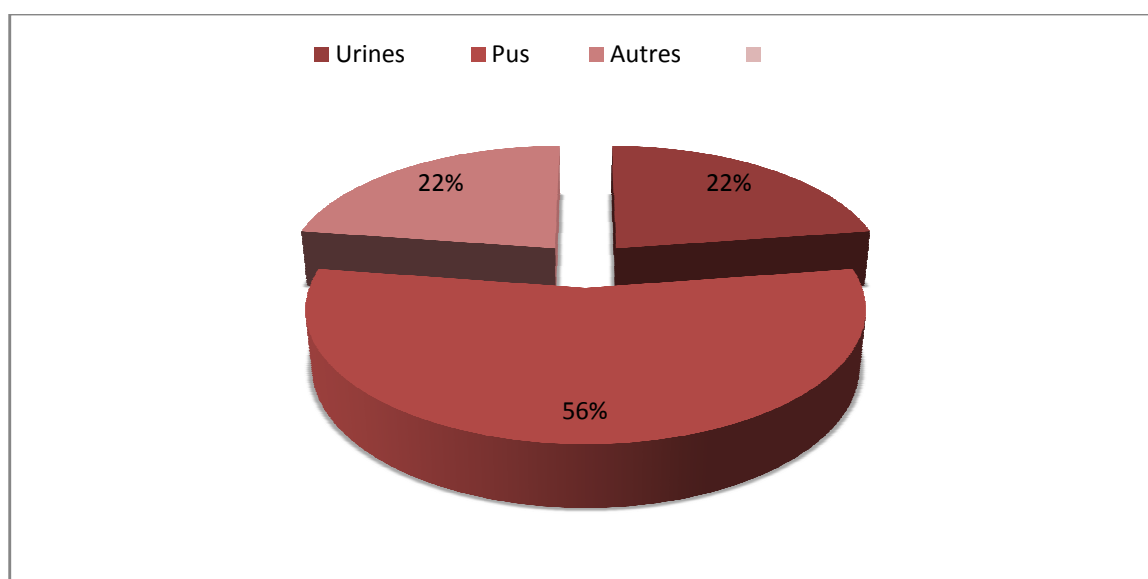


Figure 26 : Répartition des BLSE positives selon le site du prélèvement.

Commentaires :

Les souches isolées des pus produisent plus de β -lactamases à spectre élargi (56%).

6) Répartition des BLSE positives selon les services:

Tableau VIII : Répartition des BLSE positives selon les services.

Services	Effectifs	Pourcentage
Externe	13	25%
Brûlés	25	47%
Méd. int	2	4%
Réa / M	7	13%
Autres	6	11%
Total	53	100%

Réa / M : Réanimation Médical, **Autres** : (Néphrologie, Endocrinologie, Urologie, Pavillon d'urgence). **Méd. Int** : Médecine Interne.

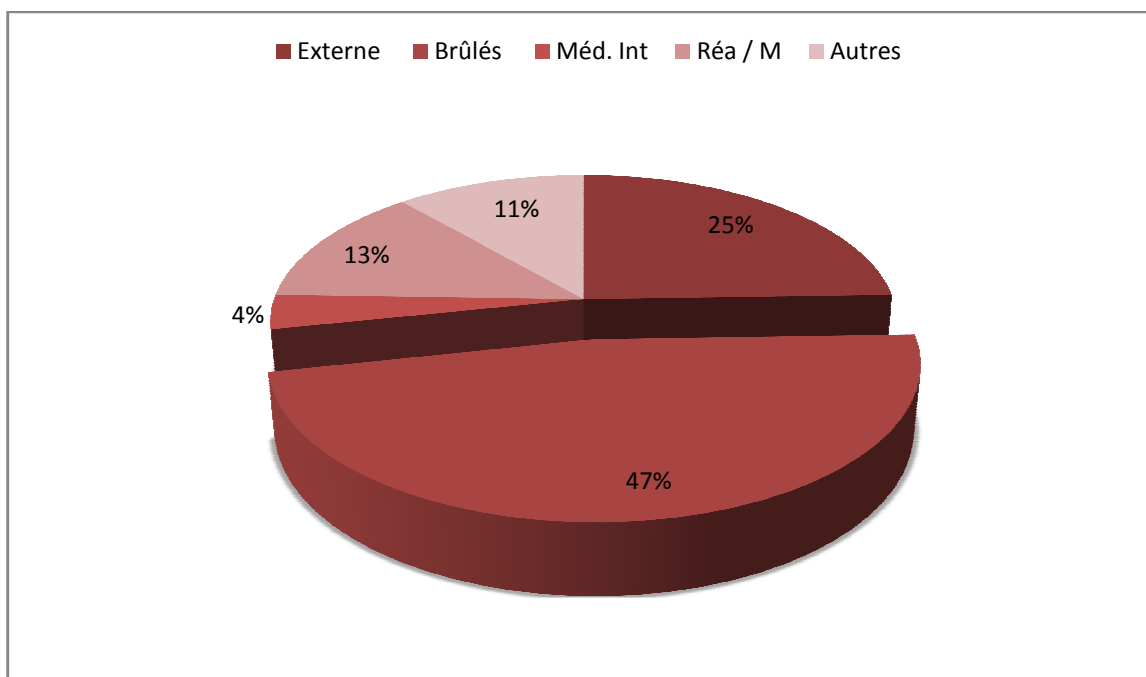


Figure 27: Répartition des BLSE positives selon les services.

Commentaires :

Le service des brûlés est le service dont les souches produisent le plus de β -lactamases à spectre élargi (47%).

7) Répartition des BLSE positives selon l'âge :

Tableau IX : Répartition des BLSE positives selon l'âge.

Espèces bactériennes	Tranche d'âge							Total
	0-9 ans	10- 19ans	20- 29ans	30- 39ans	40- 49ans	50- 59ans	>60ans	
<i>Klebsiella spp</i>	10	4	2	3	1	3	2	25
<i>Escherichia coli</i>	6	1	2	2	1	2	1	15
<i>Enterobacter spp</i>	4	2	1	1	1	1	2	12
<i>Providencia spp</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	20	7	5	6	3	6	6	53
Pourcentage	38%	13%	10%	11%	6%	11%	11%	100%

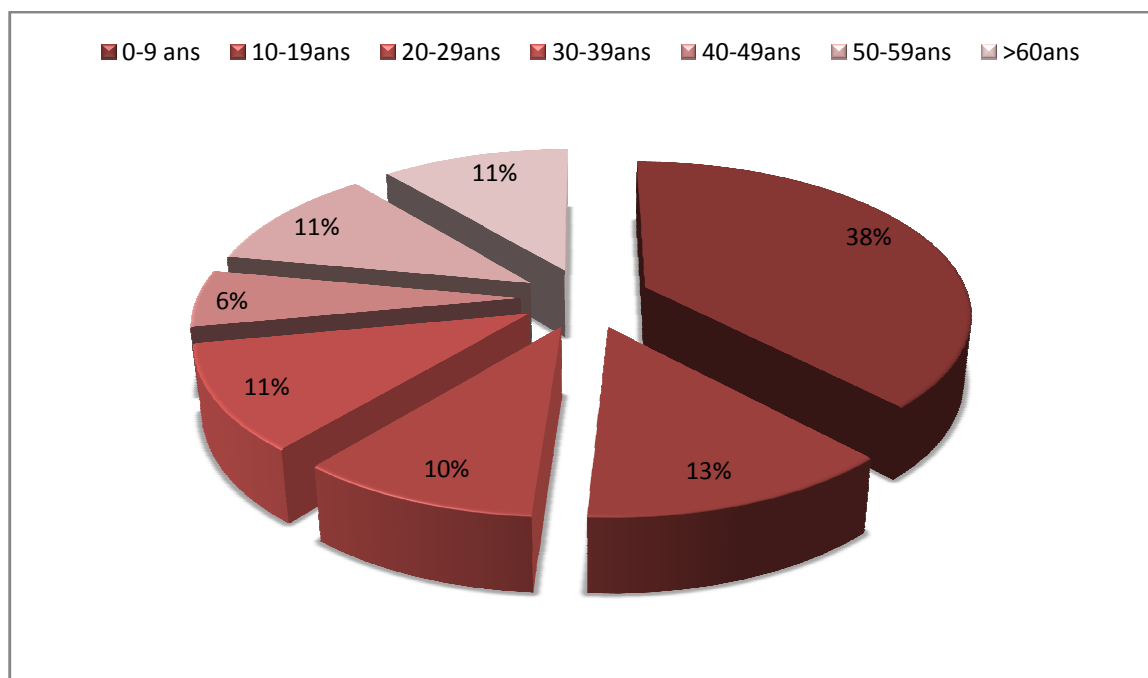


Figure 28 : Répartition des BLSE positives selon l'âge.

Commentaires :

Les β -lactamases à spectre élargi sont vus en général chez les malades dont l'âge se situe entre 0 et 9 ans (38%).

8) Répartition des BLSE positives selon le sexe (♀, ♂) :

Tableau X : Répartition des BLSE positives selon le sexe.

Sexe	Effectifs	Pourcentage
Masculin	30	57%
Féminin	23	43%
Total	53	100%

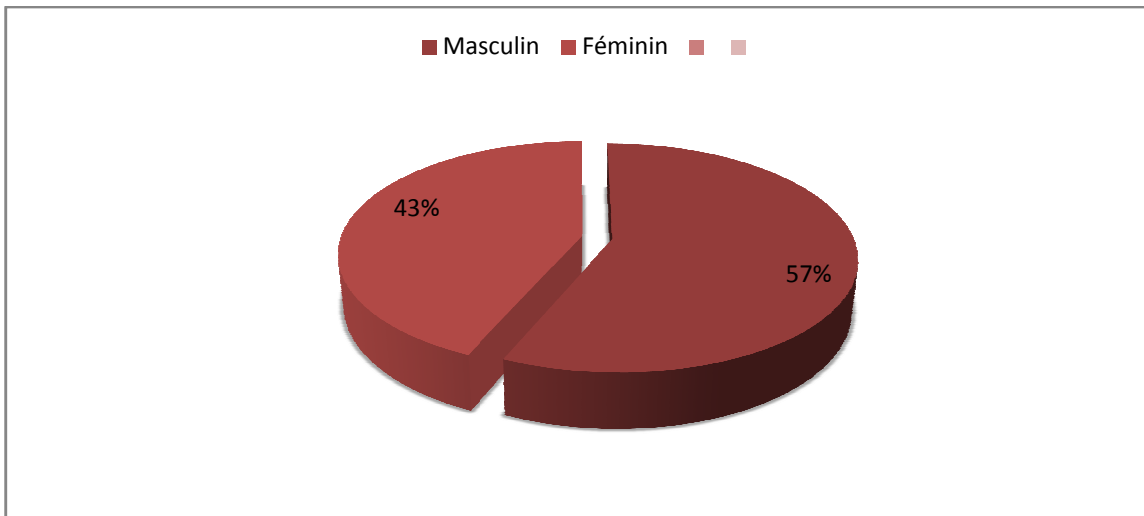


Figure 29 : Répartition des BLSE positives selon le sexe.

Commentaires :

Une prédominance des malades du sexe masculin (57%). Le sexe ratio est de 1,32.

[Sex-Ratio = M/F = 57/43 = 1,32].

9) Répartition des BLSE positives selon les 3 mois :

Tableau XI : Répartition des BLSE positives selon les 3 mois.

Espèces bactériennes	L'année 2013			Total
	Mars	Avril	Mai	
<i>Escherichia coli</i>	3	7	5	15
<i>Klebsiella spp</i>	6	13	6	25
<i>Enterobacter spp</i>	2	7	3	12
<i>Providencia spp</i>	0	1	0	1
Total	11	28	14	53
Pourcentage	21%	53%	26%	100%

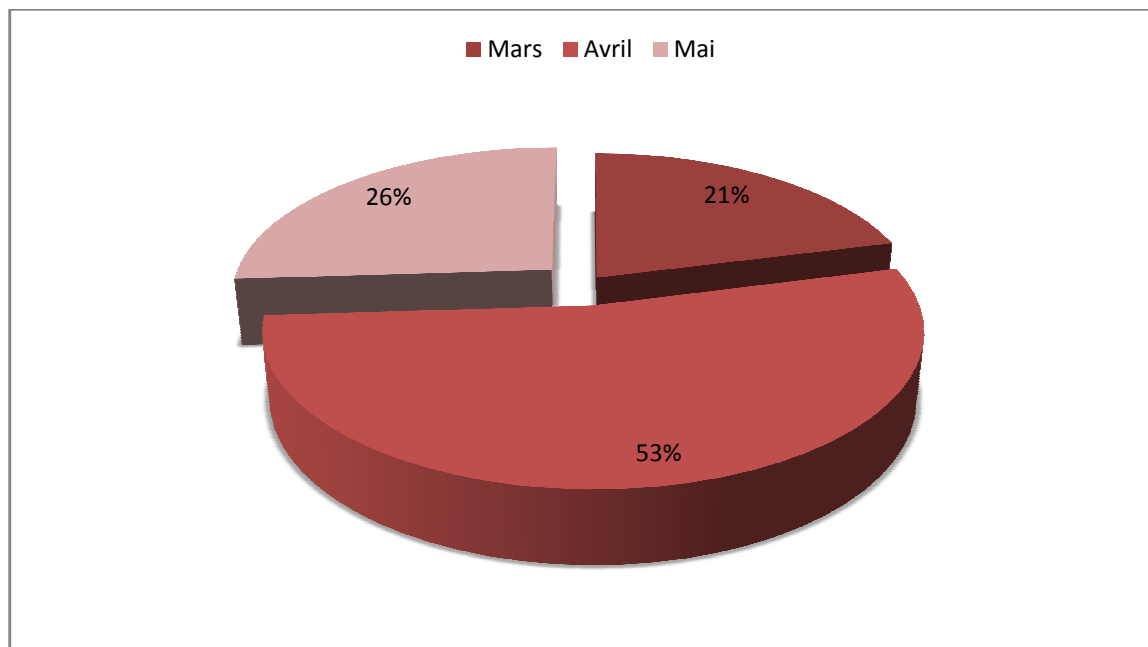


Figure 30 : Répartition des BLSE positives selon les 3 mois.

Commentaires :

On note une flambée épidémique au mois d'avril (53%) par rapport aux mois de Mars et de Mai de la même année.

10) Répartition des BLSE positives selon la région :

Tableau XII : Répartition des BLSE positives selon la région.

La région	Effectifs	Pourcentage
Banta	28	53%
Khenchela	25	47%
Total	53	100%

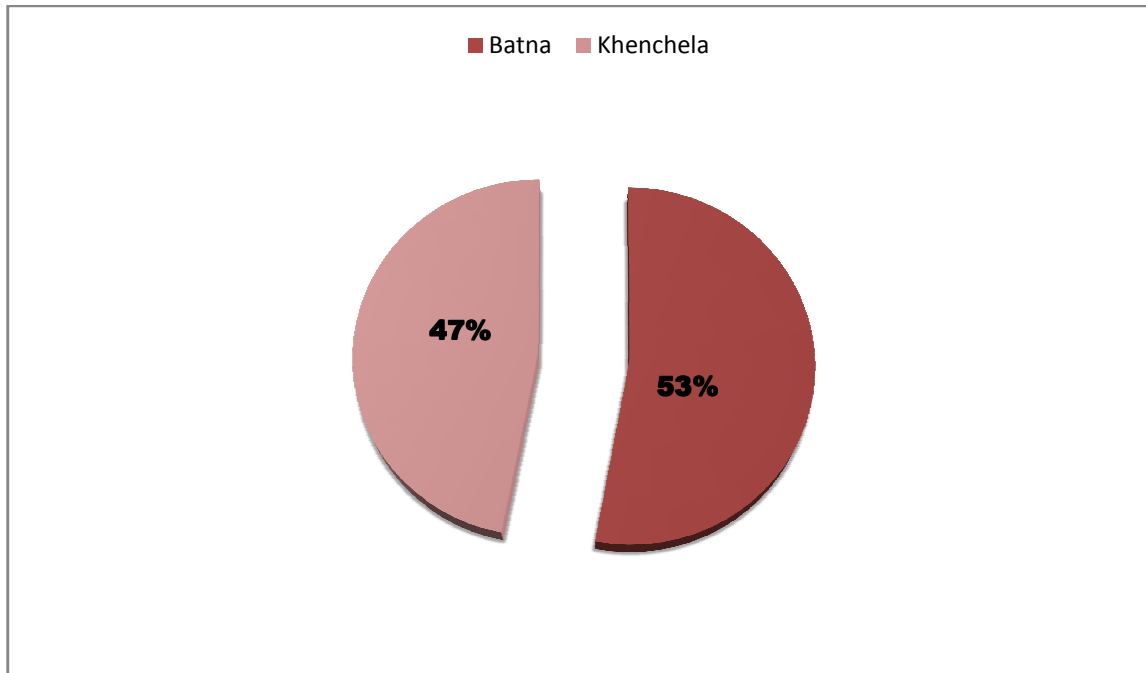


Figure 31: Répartition des BLSE positives selon la région.

Commentaires :

Une prédominance a été notée dans la région de batna avec (53%) des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi .

11) Profil de sensibilité globale de BLSE aux antibiotiques :

La BLSE présente une résistance naturelle (chromosomique) à l'ampicilline et au carbénicillines, et peut acquérir des résistances multiples. 90% des souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC).

Le taux de résistance acquise à la céfazoline s'élève à 73 % et il est de 90 % pour le céfotaxime. En revanche 70% les souches ont été sensibles aux cefamycines (FOX) et à 100% pour l'imipènème. Concernant les aminosides, on assiste une résistance pour la gentamicine 15%, l'amikacine manifeste presque le même taux de résistance 16%. Et pour les phénicolés, le chloramphénicol présente une résistance de 3% des souches.

Une excellente activité est enregistrée pour les fluoroquinolones qui marquent 2 % de souches résistantes aussi bien pour la ciprofloxacine avec des diamètres d'inhibition très importants. Pour les sulfamides et triméthoprim 30 % de souches résistent à l'association triméthoprim + sulfaméthaxazole.

Tableau XIII : La résistance associée aux β -lactamine.

Antibiotiques	Gentamicine	Amikacine	Sulfaméthoxazol -trimethoprim	Ciprofloxacine	Chloramphénicol
BLSE	15%	16%	30%	2%	3%

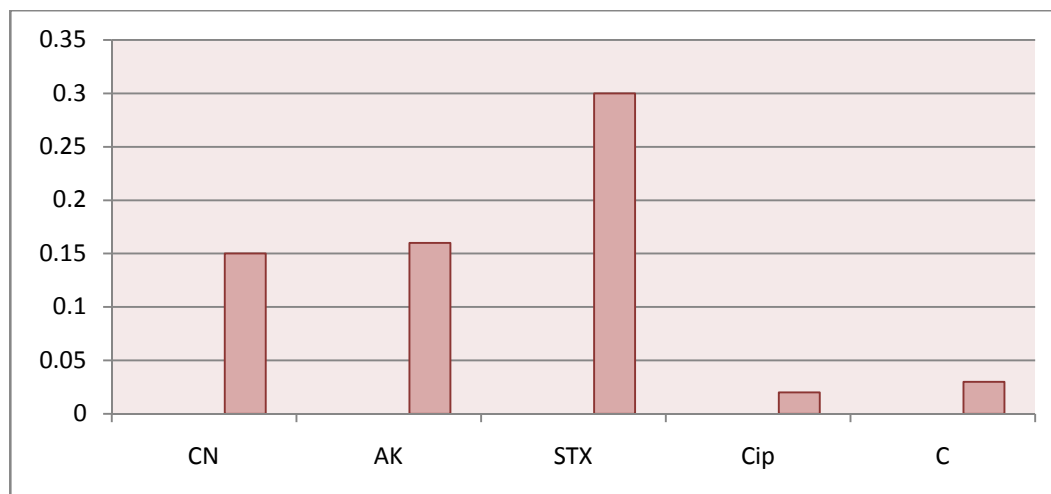


Figure 32 : La résistance associée aux β -lactamines.

12) Répartition des BLSE associées aux CHN :

Tableau XIV : Répartition des BLSE associées aux CHN.

	Effectifs	Pourcentage	Total
BLSE	41	12	53
BLSE+CHN	77%	23%	100%

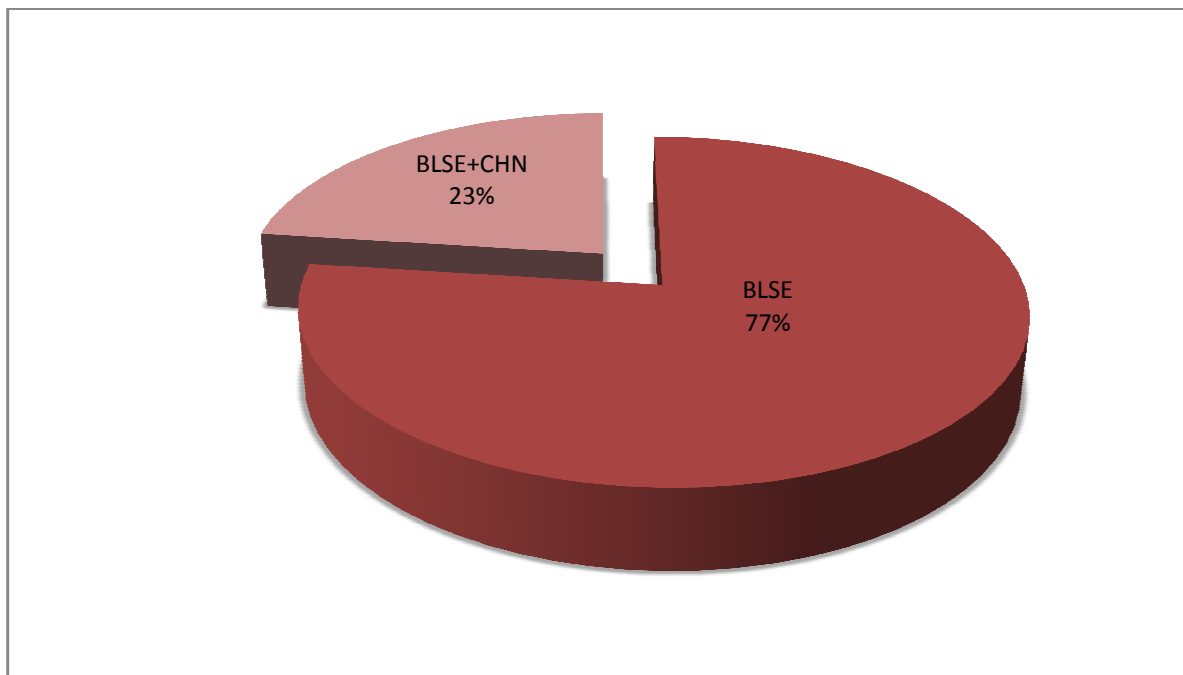


Figure 33: Répartition des BLSE associées aux CHN.

Commentaires :

Parmi les souches de β -lactamases à spectre élargi, 12 souches sont révélées porteuses de deux mécanismes de résistance (CHN+BLSE) avec comme fréquence (23%).

Discussion

Discussion :

L'objectif principal est la recherche des BLSE produites par les entérobactéries isolées dans le laboratoire central de Microbiologie du CHU de Batna et le laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet à Khenchela et les méthodes de mise en évidence de ces BLSE.

Les bactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques. Les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à Gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés. Dans cette optique, j'ai entrepris une étude sur les entérobactéries sécrétrices des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées au laboratoire central de Microbiologie du CHU de Batna et le laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet à Khenchela dans la période du 15 Mars au 31 Mai 2013. Cette étude a porté sur échantillon de 53 souches d'entérobactéries productrices de BLSE ce qui correspondait à 71%. Parmi ces espèces (BLSE positive) *Klebsiella spp* semble la souche qui produit le plus d'enzymes de β -lactamases à spectre élargi (47%), cette étude reflète les données de la littérature, [71] suivi d'*E. coli* (28%), *Enterobacter ssp* (23%) et *Providencia spp* (2%).

Les germes isolés des pus semblent beaucoup plus résistants aux β -lactamines (56%) et cela est due en général à l'utilisation abusive des antibiotiques d'une part et d'autre part à la mauvaise hygiène dans les services hospitalières, ce qui a conduit à une mutation au niveau de leur gène pour terminer à une résistance globale aux antibiotiques de la famille de β -lactamines.

Dans cette étude, la majorité des souches productrices des BLSE ont été isolées des patients hospitalisés (75%), dans les services des soins intensifs [Réanimation Médical (13%)], et des brûlés avec (47%). Dans ces services, les bactéries sont soumises à une pression élevée des antibiotiques. Bien plus, plusieurs de ces patients sont particulièrement vulnérables aux infections à cause de leur immunodéficience ou ont des portes d'accès faciles aux bactéries dues au traitement traumatisant et l'hygiène est déficiente [72].

Les BLSE sont rencontrées généralement chez des malades dont l'âge moyen se situe entre 0 et 9 ans (38%). Puis ce taux chute pour atteindre (13%) chez les malades dont l'âge est entre 10-19 ans.

Selon le sexe, il n'y a pas une grande différence dans la colonisation par les souches BLSE (57%) chez le sexe masculin et (43%) chez le sexe féminin. Le sexe ratio est de 1,32.

La comparaison des résultats avec les 3 mois de l'année 2013 [Mars, Avril, Mai], on note une flambée épidémique au mois d'avril (53%) par rapport aux mois de Mars et de Mai de la même année.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont montré en général que les entérobactéries présentent un taux de résistance aux antibiotiques communément utilisés.

Toutes les bactéries étudiées ont montré un haut niveau de résistance vis-à-vis des pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Cette multirésistance peut s'expliquer par le fait que les gènes responsables de ces résistances peuvent être portés par le même plasmide, par la coexistence de plusieurs mécanismes de résistance, ou par la production de plusieurs types enzymatiques [73,74].

Les données de la sensibilité des souches productrices de BLSE ont montré que ces souches sont non seulement résistantes à la plupart des β -lactamines, mais aussi aux antibiotiques non β -lactamines comme la gentamicine et triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Les BLSE sont généralement portées par de grands plasmides qui en plus portent aussi les gènes de résistance aux autres antibiotiques non β -lactamines tels les aminoglycosides, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, les quinolones et le métronidazole. Il a été montré que l'utilisation de ces antibiotiques contribue à la sélection des souches productrices de BLSE [50,74,72].

Les résultats de cette sensibilité aux antibiotiques ont aussi montré que toutes les souches sont sensibles à l'imipénème, et que la plupart sont sensibles à l'amikacine, au céfoxitine et au ciprofloxacine. La résistance de ces souches à la céfoxitine pourrait s'expliquer par l'hyperproduction des céphalosporinases par ces souches [49] ou par altération des porines de la membrane externe [75].

Dans la présente étude 12 souches sont réveillées porteurs de deux mécanismes de résistance (CHN + BLSE) (23%), ce qui nous a amené à rechercher le mécanisme caché (recherche de la BLSE), qu'était exprimé en utilisant la technique d'inhibition de la CHN par l'oxacilline.

Conclusion

Conclusion :

La dissémination de souches d'entérobactéries productrices de BLSE est un phénomène complexe qui procède de trois mécanismes intriqués.

- Le premier mécanisme est la dissémination clonale, dans laquelle une souche productrice de BLSE peut se disséminer par contact horizontal de patient à patient [76].
- Le second mécanisme est la transmission d'un ou plusieurs plasmides vers une autre souche (de la même espèce ou d'une espèce différente). Le troisième mécanisme est le transfert d'éléments de résistance présents dans des transposons ou intégrons entre différents plasmides.
- La transmission peut produire des épidémies locales au niveau d'une unité de soins intensifs, d'un hôpital ou un centre de soins. Elle peut s'étendre au niveau communautaire par le transfert de patients colonisés ou infectés.

Dans la majorité des cas, la transmission nosocomiale est liée au contact avec les mains du personnel soignant. Des sources de contamination ponctuelles à partir de l'environnement ont été impliquées occasionnellement comme les stéthoscopes, thermomètres, endoscopes et appareils d'échographie, baignoires, gels de bains, shampoings, ongles artificiels chez les infirmières, ainsi que les insectes comme les blattes [76].

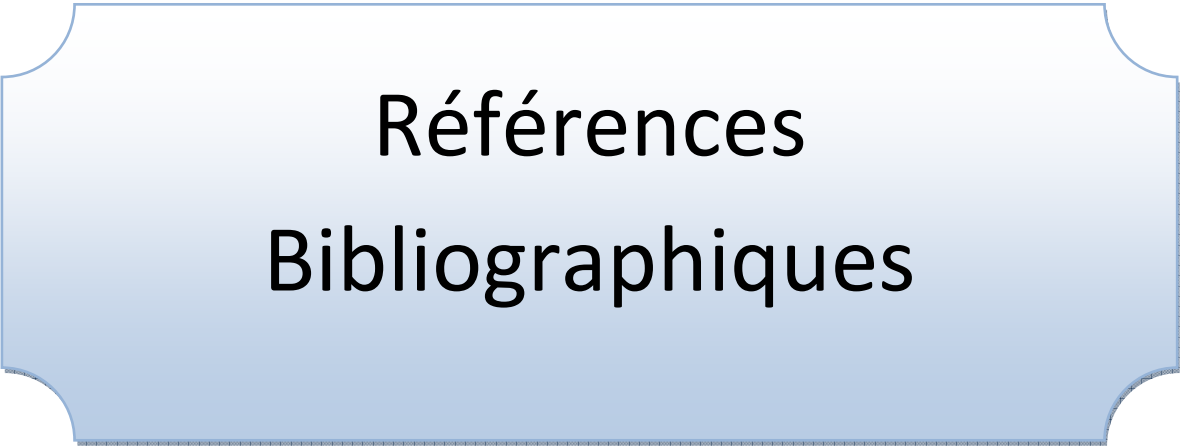
Différents facteurs en relation avec la thérapie antibiotique ont été fréquemment associés avec l'acquisition d'une souche productrice de BLSE : l'exposition préalable aux C3G (et aussi aux fluoroquinolones et aminosides), le nombre d'antibiotiques administrés et la durée du traitement . Le séjour dans les centres de soins chroniques a été aussi impliqué dans certains pays. Ces centres peuvent jouer un rôle de réservoir de souches multirésistantes d'*E. Coli* et *Klebsiella* [76].

La lutte contre la diffusion des bactéries multi-résistantes est un axe majeur de santé publique dans le monde.

Notre étude reflète l'état actuel de la résistance aux antibiotiques dans notre région, et cela est dû en général à deux choses essentielles qui ont beaucoup contribué à cette multi-résistance à savoir :

- L'utilisation abusive des antibiotiques ;
- La mauvaise hygiène dans les services hospitaliers.

D'où l'intérêt de les prendre en considération et de pallier à ce fléau par une utilisation rationnelle des antibiotiques et une hygiène, afin d'éviter la transmission croisée des bactéries BLSE positive.



**Références
Bibliographiques**

1. **Ben Redjeb S, Ben Hassen A, Hammami A, Kechrid A.** Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie, Faculté de médecine-Tunis.
2. **Maiga Ii.** Epidémiologie des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi à l'Institut Gustave Roussy. Mémoire [Diplôme interuniversitaire de spécialisation de biologie médicale]. Paris : Université René Descartes, 1992.
3. **David M Livermore,** "Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 36, no. Suppl 1 (January 15, 2003): S11–23.
4. **R. P. Ambler,** "The Structure of Beta-Lactamases," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 289, no. 1036 (May 16, 1980): 321–331.
5. **K Bush, G A Jacoby, and A Medeiros,** "A Functional Classification Scheme for Beta-lactamases and Its Correlation with Molecular Structure," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, no. 6 (June 1995): 1211–1233.
6. **George A. Jacoby and Luisa Silvia Munoz-Price,** "The New β -Lactamases," *New England Journal of Medicine* 352, no. 4 (2005): 380–391.
7. **C Kliebe, B A Nies, J F Meyer, R M Tolxdorff-Neutzling, and B Wiedemann** "Evolution of Plasmid-coded Resistance to Broad-spectrum Cephalosporins," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28, no. 2 (August 1985): 302–307.
8. **Wu Jj, Ko Wc, Tsai Sh And Yan Jj.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance QnrA, QnrB and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51** : 1223-7.
9. **Schorderet M. et coll.** Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3^{ème} édition Frisson-Roche, Paris, 1998. p.739.
10. **Lennette E. H, Balows A., Hansler W. J., Shadomy J. H. J.** Manual of clinical microbiology. 4th édition. P: 263-264.
11. **Francois.J, Chomart.M, Weber.M, Gerard.A** De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} édition : Nancy L'étoile. BIOMERIEUX, 2003,8-22.
12. **Fleming, A.** 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology* **10**:226-236.
13. **Rolinson, G. N.** 1998. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* **41**:589- 603.
14. **Bryskier, A.** 1984. [Classification of beta-lactams]. *Pathol Biol (Paris)* **32**:658 67.

15. **Moulin M. et Coquerel A.** (2002). Pharmacologie. Ed: ELSEVIER MASSON. P: 163.
16. **Page C.P., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J. et Hoffman B-B.** (1999). Pharmacologie intégrée. Ed: Boeck Supérieur. P : 425.
17. **Prescott L.M.** (2002). Microbiology, 5th edition. Ed: De Boeck. P: 808-816.
18. **Kattan, J. N., M. V. Villegas, and J. P. Quinn.** 2008. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect* **14**:1102-11.
19. **Poirel, L., and P. Nordmann.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol.Infect* **12**:826-36.
20. **Sykes, R. B., D. P. Bonner, K. Bush, N. H. Georgopapadakou, and J. S. Wells.** 1981. Monobactams--monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *J Antimicrob Chemother* **8 Suppl E**: 1-16.
21. **Brown, A. G., D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, and G. N. Rolinson.** 1976. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **29**:668-9.
22. **Samy FIGUEIREDO.** 2011. *Acinetobacter* spp. Et réservoir de gènes de carbapénèmases. **PARIS**: Innovation Thérapeutique : Du Fondamental a l'Appliqué *pôle : Microbiologie /Thérapeutiques Anti-infectieuses*, 1119
23. **Nanciel.Ch.** Abrégés de bactériologie médicale. 1^{ère} édition .paris : MASSON, 2001,55-56.
24. **Abdoul Karim Traore,** 2009 évaluations de l'efficacité d'amoxicilline + acide clavulanique dans les infections de l'arbre urinaire dans le service d'urologie du C.H.U Gabriel Toure. Bamako : faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie du Mali, 69.
25. **Ploy, T. Lambert, A. Gassama, F. Denis,** 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. ELSEVIER MASSON. 10.001.
26. **Galleni,M.Lamotte-Brasseur,J.,Raquet,X,Dubus.,A.,Monnaie,D.,Knox,J.R.& J.-M.Frère.**1995. the enigmatic catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases,*Biochem. Pharmacol.*49 : 1171-1178.
27. **Nikaido,H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516-523.
28. **Walsh, C** .2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.

29. **Levy SB, Marshall B.** *Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses.* *Nature Med* 2004; 10:S122-9.
30. **W. M.M Kirby,** “Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci,” *Science* 99, no. 2579 (1944): 452.
31. **Livermore, D.M.** 1995. β -lactamase mediated resistance: past, present and future. *J.Infect.Dis.Soc.*6: 75-83.
32. **Matagne, A., Lamotte-Brasseur J.& J-M.Frère.** 1998. Catalytic properties of class A β -lactamases : efficiency and diversity. *Biochem.J.* 330: 581-598.
33. **Normak,B.H.& S. Normak.**2002.Evolution and spread of antibiotic resistance .*J Intern.Med.*, 252: 91-106.
34. **Kunin,C.M., K.S.Johansen,A.M.Worning,& F.D.Daschner.**1990.Report of a symposium on use and abuse of antibiotics world wide .*Rev. Infect.Dis.* 12: 12-19.
35. **Ambler, R.P.**1980.The structure of β -lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.(Biol.)* 289:321-331.
36. **Philippon, A., Arlet, G.& G.A.Jacoby.**2002.Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: &1-11;
37. **Galleni,M., Lamotte-Brasseur, J.,Rossolini,G.M., Spencer, J .,D ideberg, O., J.M. Frère & The mettalo- β -lactamase working group .**2001.Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 660-663.
38. **Charles F. Gravenkemper, Jean L. Brodie, and William M. M. Kirby,** “Resistance of Coagulase-Positive Staphylococci to Methicillin and Oxacillin,” *Journal of Bacteriology* 89, no. 4 (April 1965): 1005–1010.
39. **J. T. Smith,** “Penicillinase and Ampicillin Resistance in a Strain of *Escherichia Coli*,” *Journal of General Microbiology* 30, no. 2 (February 1, 1963): 299–306.
40. **Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi,** “Transferable Resistance to Cefotaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* and *Serratia Marcescens*,” *Infection* 11, no. 6 (1983): 315–317.
41. **Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G.** “*Klebsiella Pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae* Producing Novel Plasmid-mediated beta-lactamases Markedly Active against Third generation Cephalosporins: Epidemiologic Studies,” *Review of Infectious Diseases* 10, no. 4 (1988): 850.

42. **Philippon, G. Arlet, and P. H. Lagrange**, “Origin and Impact of Plasmid mediated Extended-spectrum Beta-lactamases,” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 13 (1994): 17–29.
43. **P. Nordmann and L. Poirel**, “Emerging Carbapenemases in Gram-negative Aerobes,” *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8, no. 6 (June 2002): 321–331.
44. **Laurent Poirel, Johann D Pitout, and Patrice Nordmann**, “Carbapenemases Molecular Diversity and Clinical Consequences,” *Future Microbiology* 2, no. 5 (October 2007): 501–512.
45. **Bauernfeind A, J M Casellas, M Goldberg, M Holley, R Jungwirth, P Mangold, T Röhnisch, S Schweighart, R Wilhelm** “A New Plasmidic Cefotaximase from Patients Infected with *Salmonella Typhimurium*,” *Infection* 20, no. 3 (1992): 158–163.
46. **M. Gniadkowski. I.Schneider, A. Pałucha, R. Jungwirth,B.Mikiewicz,and A. Bauernfeind**, “Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Hospital in Warsaw, Poland: Identification of a New CTX-M-3 Cefotaxime- Hydrolyzing beta-Lactamase That Is Closely Related to the CTX-M-1/MEN-1 Enzyme,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, no. 4 (1998): 827–832.
47. **Quentin, C., Arpin, C., Dubois, V., André, C., Lagrange, I., Fischer, I., Brochet, J.-P., Grobost, F., Jullin, J., Dutilh, B., Larribet, G., Noury, P.** “Antibiotic Resistance Rates and Phenotypes Among Isolates of Enterobacteriaceae in French Extra-hospital Practice,” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23, no. 3 (2004): 185–193.
48. **C. Arpin ,Quentin C ,Coulange L ,Andre C ,Grobost F , Dubois V , Robert J ,Cambau E** “Nationwide Survey of Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in the French Community Setting,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, no. 6 (2009): 1205–1214.
49. **Bradford P.A.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-51.
50. **Paterson D.L, Bonomo R.A.** Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657-86.

51. **Cosgrove, S .E., Kaye,K.S., Eliopoulous, G.M.&Y. Carmeli.**2002. Health and economic outcomes of the emergence of third- generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch. Intern.Med.* 162:185-190.
52. **Walsh, T.R., Tolmen,M.A., Poirel,L., & P.Nordmann.**2005. Metallo- β -lactamases : the quiet before the storm *Clin.Microbiol.Rev.* 18: 306-325.
53. **Jacoby GA., Bush K. Betalactamase nomenclature. J.** Clin Microbiol. 2005; 43(12):6220.
54. **Jean Louis Fauchere.** Bactériofiches : Techniques en bactériologie clinique. Edition Marketing S.A, 1997.
55. **Jehl F., Chomarat M., Weber M. et coll.** De l'antibiogramme à la prescription. Editions BIOMERIEUX, Mars 2003.
56. **Keita Abdelaye :** Résistance aux antibiotiques des bactéries isolées chez les malades en consultation externe au service de bactériologie à l'I.N.R.S.P. (Institut national de recherche en Santé publique). Année scolaire 1998- 1999.
57. **Rahal J.J.** 2000. Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? *J Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **6** (Suppl 2): 2-6.
58. **Arlet G, Philippon A.** 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab*; **352**: 41-55.
59. **Gniadkowski M.** 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (EBLSs) and EBLS-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* **7**: 597-608.
60. **Bush K.** 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobiol therapy. *J Clin .Infect .Dis* **32**: 1085-1089.
61. **Hansen D.S, Mestre F, Alberti S.**2003. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing. Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin.Microbiol* **37**: 56-62.
62. **Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM.** Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:144-153.
63. **Gniadkowski M.** Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol. Infect* 2008; 14:11-32.
64. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14;
65. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N.**

CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:165-74.

66. **Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin .Microbiol .Infect* 2008; 14(Suppl. 1):33-41.
67. **Cantón R, Coque TM.** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr .Opin.Microbiol* 2006; 9:466-75.
68. **Francois.D, Marie-Cecile.P, Christian.M, Edouard.B, Roland.Q.** Bactériologie Médicale, technique usuelles. MASSON, 2007,6.
69. **Document édité avec la collaboration de l'OMS.** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle Nationale (Medecine Humain et Veterinaire 6^{ème} edition 2011.159.
70. **Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D.** 2004: evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL E-test to detect extended-spectrum β -lactamasesn in Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrobiol. Chemotherapy* **54**: 134-138.
71. **Decré D, Gachot B, Lucet J.C, Arlet G, Régnier B.** 2000. Surveillance épidémique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu (K.p BLSE) dans un service de réanimation. *Rev Française des laboratoires* **320**: 31-38.
72. **Xiong,Z., Zhu,D., Wang.F, Zhang,Okamoto,Y.R.&A.Inoue.**2002. Investigation of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* from China. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*44:195 -200.
73. **Sirof, D.** 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J.Antimicrob.Chemother.*36 (suppl.A): 19-34.
74. **Jacoby, G.A.1997.** Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxymino- β -lactams. *Infect.Dis.Clin.North America.*11:875-887.
75. **Coudron, P.E., Moland,E.S.,&K.S.,Thomson .**2000.Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center.*J.Clinic.Microbiol.* 38:1971-1976.
76. **H. Rodriguez-Villalobos, M. J.** Struelens. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. ALSEVIER, Belgique Réanimation 15 (2006) 205–213.

Annexes

Annexe 1 : Matériel utilisé

1. Instruments et appareillage :

Anse de platine, Bec Bunsen, Pipettes Pasteurs, Boîtes de Pétri, Etuves, tubes à vis, Pipettes de 1 et de 10 ml, chambre froide, Pincettes, écouvillons stériles, Gangs stériles, densitomètre, distributeur d'antibiotiques, portoirs, Paire de ciseaux stérile, Galerie biochimique API 20^E.

2. Milieux de culture :

Gélose nutritive, gélose au sang cuit (chocolat), bouillon nutritif, milieu Mannitol-Mobilité, milieu urée-indole, milieu urée-tryptophane (**Urée**- Indole), milieu de TSI, milieu Hektoen, milieu BCP (Bleu de Bromocrésol Pourpre), milieu Muller Hinton (MH).

3. Antibiotiques :

Les antibiotiques utilisés pour la réalisation d'antibiogramme sont résumés dans le tableau avec leurs abréviations

Tableau 1 : liste des antibiotiques à tester pour les entérobactéries :

Antibiotiques pour les entérobactéries	
Ampicilline (AMP)	Amikacine (AK)
Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	Gentamicine (CN)
Céfalotine (KF)	Ciprofloxacine (CIP)
Céfoxitine (FOX)	Colistine (CT)
Céfotaxime (CTX)	Chloramphénicol (C)
Céfuroxime (CFM)	Fosfomycine (FOS)
Imipénème (IMP)	Triméthoprim + Sulfaméthoxazole (STX)

Tableau 2 : Disques d'antibiotiques utilisés pour les tests de confirmation :

Antibiotiques	Charges (µg)
Céfotaxime (CTX)	10
Céftazidime (CAZ)	30
Aztreonam(ATM)	30
Amoxicilline/ acide clavulanique (AMC)	20 /10

Annexe 2 : Examen microscopique

1. Observation microscopique à l'état frais

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- Prélever une fraction de colonies sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci (ou prélever une petite goutte de bouillon). Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et **en remuant très délicatement** (afin de ne pas casser les flagelles).
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- Observer rapidement à **l'objectif ×40**
- Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant à large spectre car les bactéries sont vivantes...

2. Observation microscopique avec coloration de Gram :

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Coloration : **violet de gentiane phéniqué durant une minute**. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.
- Rincer à l'eau du robinet
- Mordantage : recouvrir la lame de **réactif de Lugol 1 minute** (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).
- Rincer à l'eau
- Epreuve (alcoolo-résistance) : **Plonger 3 ou 4 fois une demi-seconde dans un pot d'alcool** puis rincer à l'eau du robinet immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram moins sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram moins sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram plus ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet.
- Contre coloration : **Fuschine diluée au 1/20^{ème} ou de safranine pendant une minute**. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses.
- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.
- Observer à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.

- Remarque : la coloration de Gram est parfois appelée **coloration V.L.A.F** afin de se rappeler les colorants et dans quel ordre ils doivent être utilisés (**Violet, Lugol, Alcool, Fuschine**).

Annexe 3 : milieux de culture utilisés pour l'isolement des Germes.

➤ **BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre)**

Usage : isolement non sélectif en particulier pour les Entérobactéries

Composition: 1litre

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Lactose	10,0 g
Bromocrésol pourpre	0,025 g
Agar	11,0 g
pH	6,8

Lecture:

Toutes les bactéries de culture facile cultivent sur ce milieu.

- Les colonies lactose positif sont jaunes ;
- Les colonies lactose négatif restent violettes.

➤ **Gélose Hektoen**

Usage : isolement des bacilles à Gram négatif.

Composition: 1litre

protéose-peptone	12,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	12,0 g
Saccharose	12,0 g
Salicine	2,0
Gcitrates de fer III et d'ammonium	1,5 g
Sels biliaires	9,0 g
Fuchsine acide	0,1 g
Bleu de bromothymol	0,065 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Agar	13,0g
pH =	7,5

Lecture:

Les colonies sont normalement des colonies de bacilles Gram négatif.

- Les colonies à centre noir sont H₂S positif .
- Les colonies bleues ou vertes n'utilisent aucun des glucides du milieu.
- Les colonies jaunes utilisent un ou plusieurs des glucides. Elles sont donc saccharose et/ou lactose et/ou salicine positives

Elles sont donc saccharose et salicine et lactose négatives. La couleur bleue peut être due à l'utilisation du citrate. Un précipité de sels biliaires peut apparaître pour les souches acidifiante

Annexe 4 : milieux de culture utilisés pour l'identification des Germes.

On a utilisée deux types de galeries pour l'identification des germes au laboratoire :

- la galerie biochimique classique.
- La galerie API20 E.
- **La galerie biochimique classique :**

Elle permet l'identification des Bacilles à Gram négatif, elle est composée de :

- **Urée tryptophane (Urée Indole) :**

Le milieu urée-indole contient:

- De l'urée: recherche de l'uréase.
- Du tryptophane:
 - recherche du tryptophane désaminase (TDA).
 - recherche de la production d'indole.

Usage: recherche de l'indole, de l'uréase et de la TDA

Composition: 1litre

Urée	2,0 g
L-tryptophane	0,3 g
éthanol à 0,95	1 ml
rouge de phénol	2,5 mg
chlorure de sodium	0,5 g
Dihydrogénophosphate de potassium	0,1 g
Hydrogénophosphate de potassium	0,1 g

pH	7
----	---

Lecture :

- milieu rouge (basique): (uréase +);
- milieu orange ou jaune: (uréase -).

Après addition de réactif de Kovacs:

- anneau rouge :(indole +) ;
- anneau jaune :(indole -).

Après addition de chlorure de fer III:

- marron : (TDA +) ;
- jaune : (TDA -).

➤ **Milieu TSI (Tree Sugar Iron):**

Usage : utilisation du lactose, fermentation du glucose, production d'H₂S

Composition : 1 litre

Peptone	15,0 g
extrait de viande	3,0 g
extrait de levure	3,0 g
peptone pepsique de viande	5,0 g
Glucose	1,0 g
Lactose	10,0 g
Sacharose	10,0 g
Rouge de phénol	0,024 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sulfate de fer II (Pasteur)	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Agar	11,0 g
pH	7,5

Lecture :

- Pente jaune : lactose et/ou saccharose +,
- Pente rouge : lactose et saccharose –
- Culot jaune : glucose + et aéro-anaérobie,

- Culot rouge : glucose - ou aérobie stricte.
- Présence d'un précipité noir : H₂S +

➤ **Mac Conkey (Gélose)**

Usage: isolement des bacilles Gram négatif.

Composition: 1litre

Peptone	20,0 g
Lactose	10,0 g
sel biliaires	5 g
cristal violet	0,001 g
Rouge neutre	0,05 g
chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g

Lecture :

- Colonies rouges: lactose +
- Colonies jaunes ou incolores: lactose –

Seuls les bacilles Gram négatif se cultivent sur ce milieu en raison des sels biliaires.

- **Mannitol-Mobilité-Nitrate**

Usage: utilisation du mannitol, réduction des nitrates, mobilité en gélose semi-molle

Composition: 1litre

Hydrolysate tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,4 mg
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
pH	7,6

Lecture :

- Milieu jaune: mannitol positif
- Milieu rouge: mannitol négatif

Pour une bactérie aérobie stricte, la culture sur toute la hauteur accompagnée éventuellement de bulles montre une respiration nitrate. La réduction des nitrates pourra être visualisée par addition des réactifs habituels. Leur acidité entraîne un virage progressif au jaune

d'un milieu rouge: une coloration rouge après addition des nitrites 1 et 2 montre donc bien la présence de nitrites.

Mueller Hinton(Gélose)

Usage: Gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

Composition: 1litre

Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0 g
pH	7,4

Lecture :

Cette gélose standardisée est la gélose permettant de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries. Elle peut être additionnée de sang (pour les *Streptococcus*), d'extrait globulaire (pour *Haemophilus*),

Elle doit être coulée en boîte de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm. Il existe un bouillon équivalent.

➤ **Milieu MH/Cloxacilline :**

Composition :

Cloxacilline (500mg/l)	125µl
Gélose Mueller-Hinton	250ml

Préparation :

- Faire fondre la gélose MH, ramener à 50°C,
- incorporer la solution mère de cloxacilline dans la gélose,
- homogénéiser et couler en boîte de Pétri

Galerie API20E

Principe :

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

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Technique :

- Préparation de la galerie :
 - Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
 - Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum :
 - Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.
- Inoculation de la galerie :
 - Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
 - Remplir uniquement les tubes des autres tests.
 - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
 - Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Identification :

- Avec le tableau d'identification :

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

- Avec le catalogue analytique :

Avec le catalogue analytique :

- Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun.
- Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.
- On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification.
- Avec un logiciel d'identification

Tableau de lecture de la galerie API20E

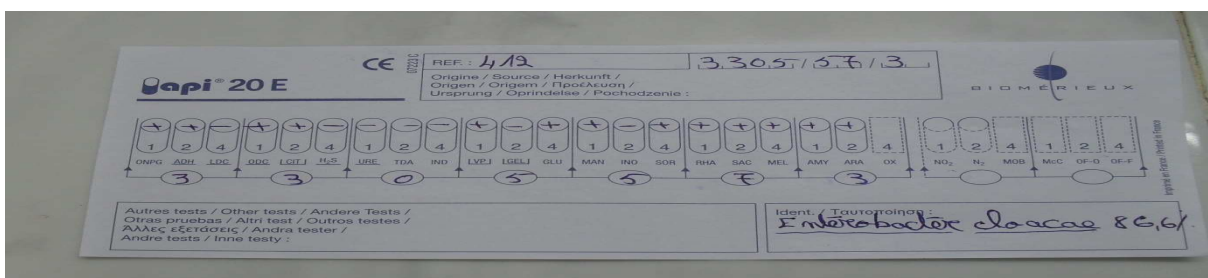


Figure 1 : identification d'*Enterobacter cloacae* par la Galerie API20E.

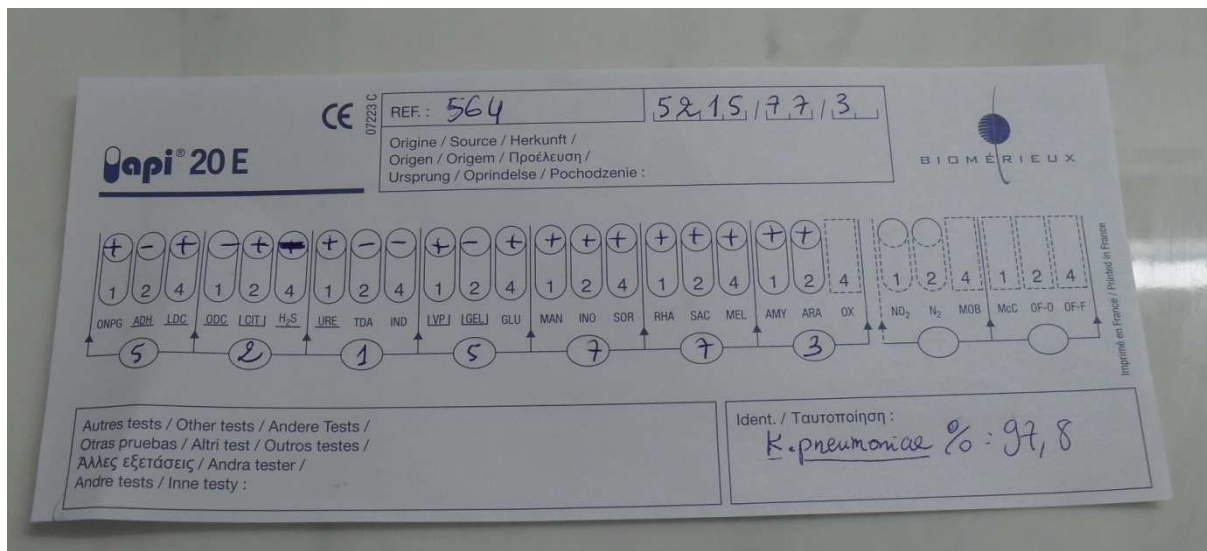


Figure 3: identification de *Klebsielle pneumoniae* par la Galerie API20E.

Annexe 5:l'antibiogramme

1. Définition :

L'antibiogramme ou la détermination de la sensibilité des bactéries aux agents antibactériens est l'étude de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration réalisée dans un milieu de culture.

2. But de l'antibiogramme :

Le but essentiel de l'antibiogramme est l'aide à la décision thérapeutique, il sert également à :

- La surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne qui orientera ultérieurement l'antibiothérapie probabiliste.
- La comparaison des phénotypes de résistance de souches présumées responsables d'infections nosocomiales.
- L'identification bactérienne par la mise en évidence des résistances naturelles.

3. Principe de l'antibiogramme :

La technique consiste à déposer à la surface de la gélose préalablementensemencée avec une suspension bactérienne, des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques ; il existe des disques spécifiques des bactéries à Gram négatif et des disques spécifiques des bactéries à Gram positif. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la gélose, une concentration d'antibiotique égale à la CMI le profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries peut être déterminé par les

diamètres des zones d'inhibition des colonies incubées sur boîtes en contact avec les disques des antibiotiques.

Antibiogramme par diffusion des disques

a. Milieu pour antibiogramme

- Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses doivent être sèches avant l'emploi.

b. Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable dans la technique CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) préconisée par l'OMS.

c. Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélose, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

d. application des disques d'antibiotiques :

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.
- e. **Conditions d'incubation :**
- Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie.
- f. **Lecture :**
- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
 - Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.
 - Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton au sang, les mesures de diamètres de zones d'inhibition seront prises, boîte de Pétri ouverte et bien éclairée.
 - Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
 - Classer la bactérie dans l'une des catégories I= Intermédiaire, R= Résistant, S= Sensible

Tableau 3 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10 µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10 µg	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Céfazoline	30 µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Céfalotine	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefoxitine	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Céfotaxime	30 µg	≤ 22	23 - 25	≥ 26
Ceftriaxone	30 µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Imipénème/Meropénème	10 µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Ertapénème	10 µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Acide nalidixique	30 µg	≤ 13	14 - 18	≥ 19
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16- 20	≥ 21
Chloramphénicol	30 µg	≤ 12	13- 17	≥ 18
Furanes	300 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17

Fosfomycine	200 µg	≤ 12	13 - 15	≥ 16
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,7 5 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16

I= Intermédiaire, R= Résistant, S= Sensible

Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories: S= sensible, R= résistant, et I= intermédiaire, en se référant aux normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

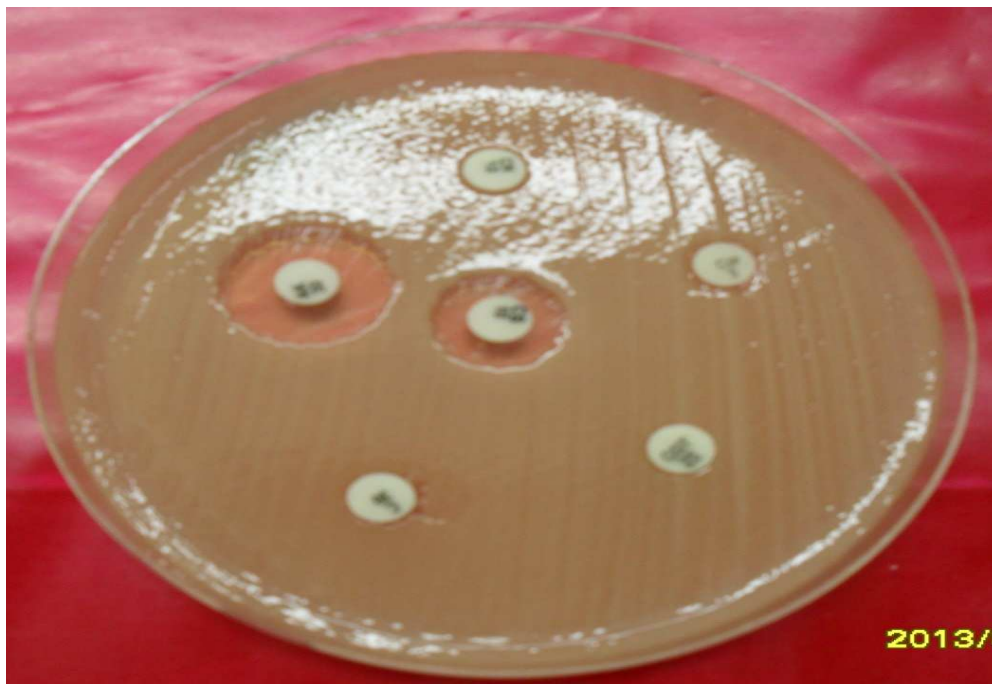
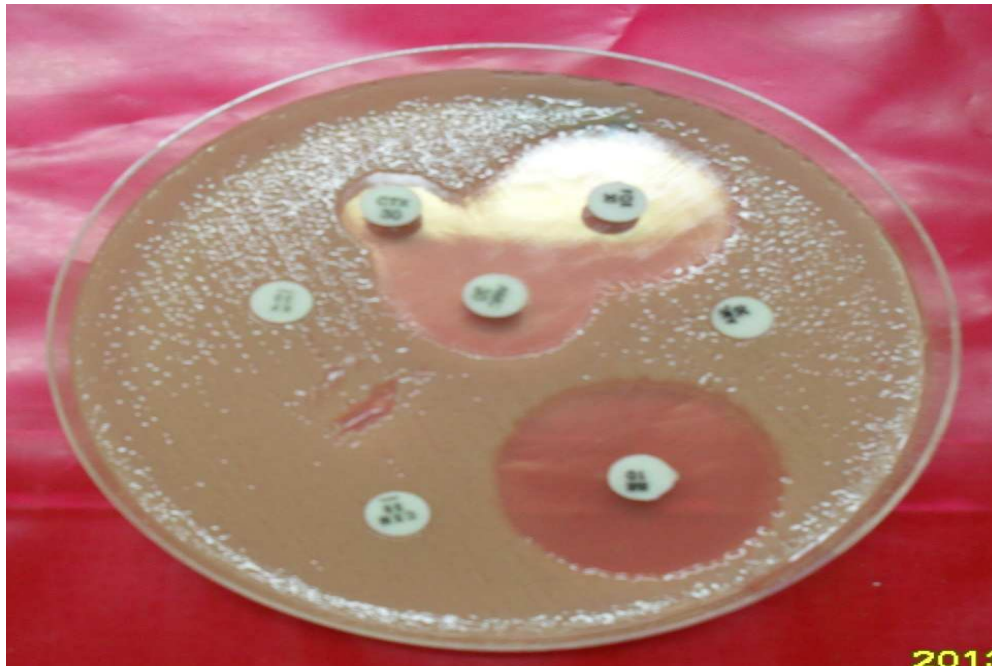


Figure4 : l'antibiogramme d'une souche d'*Enterobacter spp* productrice de BLSE

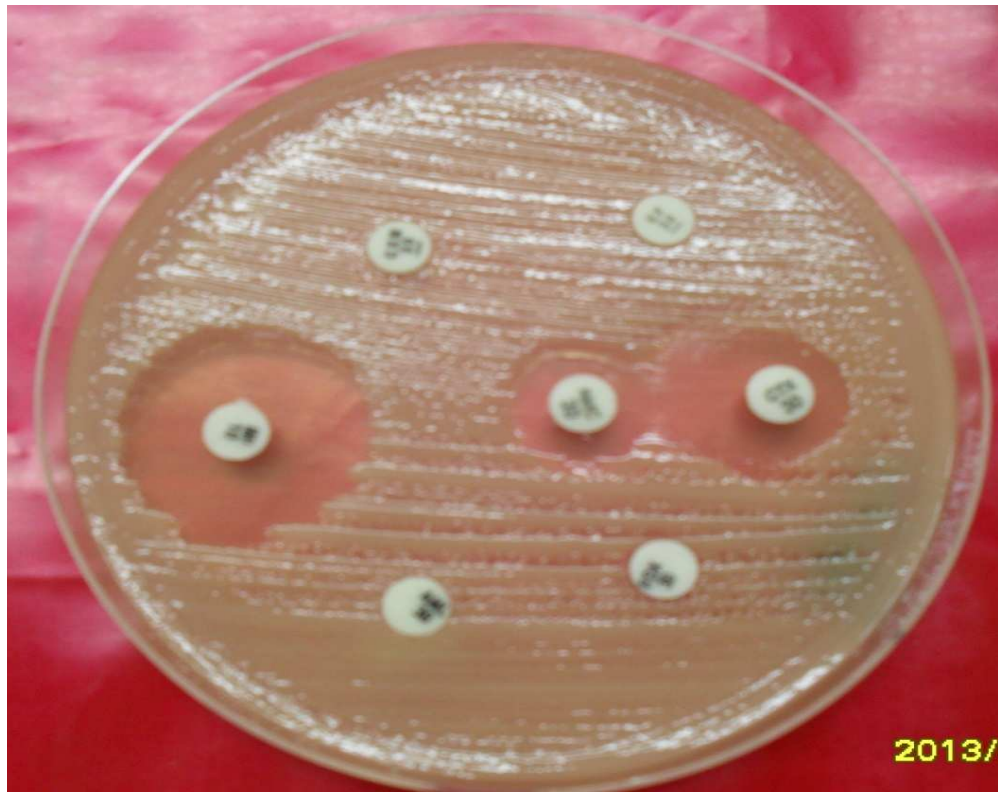


Figure 5: l'antibiogramme d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE



Figure 6 : l'antibiogramme d'une souche d'*Escherichia coli* productrice de BLSE

Abstract:

This study focused on strains of Enterobacteriaceae producing beta-lactamases extended spectrum (ESBL) in the central laboratory of Microbiology of the University Hospital of Batna and laboratory Grande Clinic Mezdaouet Khenchela. These strains were isolated from various samples (urine, blood, pus) has been the subject of a classic study with enrichment steps, isolation and identification. 53 strains belonging to four species were divided according to several parameters (sampling, age, sex, month and services). Klebsiella spp is the most isolated (47%) species, followed by Escherichia coli (28%). The majority of strains were isolated from pus, in men, in patients aged birth to nine years in service burned in two and a half months of 2013. The ESBL-producing strains are usually hospital (75%) compared to external strains (25%). The synergy between AMC records and C3G obtained by several techniques (Double disc (Spanish test), reconciliation and cloxacillin disk test).

Keywords: β -lactamases, beta-lactamases extended spectrum, *Enterobacteriaceae*, synergy test.

ملخص:

تركز هذه الدراسة على سلالات الانتيروبيكتيري المفرزة للانزيم بيتالاكتاماز ذو الطيف الموسع من مخبر الاحياء الدقيقة بالمستشفى الجامعي بباتنة ومن مخبر العيادة الكبرى مزداوت بخنشلة . تم عزل هذه السلالات من عينات مختلفة (البول والدم والقيح) يهدف بعلاج تقليدي مع خطوات من العزلة والاثراء وتحديد الهوية. تم عزل 53 سلالات تنتمي إلى أربعة أنواع وفقا لعدة معايير (أخذ العينات، والعمر والجنس والشهر والخدمات) الكلبسيلا هي أكثر الأنواع عزلة (47%) ، تليها كولاي (28%). تم عزل معظم سلالات من صديد، في الرجال، في المرضى الذين تتراوح أعمارهم بين الولادة وحتى تسع سنوات، في قسم الحريق خلال فترة شهرين ونصف من سنة 2013. السلالات المنتجة ل الانتيروبيكتيري المفرزة للانزيم بيتالاكتاماز ذو الطيف الطويل عادة ما تكون (75%) بالمستشفى مقارنة بسلالات المجتمع من المدينة (25%).

التأزر بين قرصين الاموكسيسيلسن وحمض الكلافيلانيك و السيفالوبيورين ذو الفئة الثالثة والذي نحصل عليه بالعديد من التقنيات (أسطوانة مزدوجة اختبار الإسبانيولي) تقريبا الاقراص وتوسيع النطاق باختبار (كلوكساسيلين)

كلمات البحث: بيتالاكتاماز ، بيتالاكتاماز ذو الطيف الموسع، الانتيروبيكتيري، اختبار التأزر .

Présenté par: BOUZIANE Houda

Date de soutenance : 01 -07- 2013

Bêta- lactamases à spectre élargi : profil de résistance des souches isolées et mise en évidence au laboratoire

Résumé :

Cette étude a porté sur des souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) au laboratoire central de Microbiologie du CHU de Batna et le laboratoire de la Grande Clinique Mezdaouet de Khenchela. Ces souches ont été isolées à partir de divers prélèvements (Urines, Sang, Pus) qui ont fait l'objet d'une étude classique avec des étapes d'enrichissement, d'isolement et d'identification. 53 souches appartenant à quatre espèces ont été réparties en fonction de plusieurs paramètres (prélèvements, âge, sexe, services et mois). *Klebsiella spp* est l'espèce la plus isolée (47%), suivi d'*Escherichia coli* (28%). La majorité des souches ont été isolées à partir du pus, chez les hommes, chez les patients âgés entre la naissance jusqu'à 9 ans, au niveau de service de brûlés au cours de deux mois et demi de l'année 2013. Les souches productrices de BLSE sont généralement hospitalières (75%) par rapport aux souches externes (25%). La synergie entre deux disques d'AMC et C3G obtenu par plusieurs techniques (Double disque (test espagnol), rapprochement de disque et test cloxacilline).

Mots-clés : β -lactamases, bêta-lactamases à spectre élargi, entérobactéries, test de synergie

Lieu d'étude :

- Laboratoire centrale de microbiologie du CHU de Batna.
- Laboratoire de Grande Clinique Mezdaouet.