



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 académique en
Biologie
Option : Microbiologie

Thème

Acinetobacter spp: formation de biofilm et résistance aux antibiotiques

Soutenu par :

BOUTARFI Zakaria

Devant le Jury

Président :	M ^{elle} LAKHDARI Soumia	M.A.	Université de Khenchela
Encadreur :	M ^r KASSAH- LAOUAR Ahmed	Pr.	Université de Batna
Co- Encadreur :	M ^{elle} CHORFI Keltoum	M.A.	Université de Khenchela
Examinatrice :	M ^{me} HALASSI Ismahan	M.A.	Université de Khenchela
Invité :	M ^{elle} YAKHLEF Wahiba	M.A.	Université de Khenchela

Année Universitaire : 2013-2014

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance a mon promoteur de mémoire Pr. KASSAH-LAOUAR Ahmed qui m'a suivi et encouragé tout au long de ce travail, je le remercie pour son infinie patience et pour ses efforts

. A mon Co Encadreur M^{elle} CHORFI Keltoum, pour sa patience, sa compréhension et son aide.

Je tiens à remercier la présidente de jury : M^{elle} LAKHDARI Soumia pour avoir accepté de présider ce jury, qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

J'exprime ma profonde gratitude à l'examinatrice : M^{me} HALLASSI Ismahane. C'est une grande joie pour nous de vous avoir parmi nous, malgré vos multiples occupations, vous avez tenu à m'honorer par votre présence

A M^{elle} Yakhllef Wahiba merci d'avoir accepté l'invitation, c'est un honneur de vous avoir parmi nous

Enfin, je remercie Mr BADIS Z. pour son aide dans la préparation des tampons et pour le temps qu'il m'a consacré et M^{elle} KHADOUMA Asma pour son aide.

Dédicaces

*A la mémoire de mon défunt **père** qui nous a quittés très tôt, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, merci pour tous tes sacrifices. Que dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

*À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre, à cette source de tendresse, de patience et de générosité, **ma mère**, Merci pour ton soutien, tes encouragements, et tes sacrifices.*

*A **ma belle-mère Elhadja**, Merci pour tes conseils et tes encouragements tu es toujours présente quand j'ai besoin de toi.*

*A **mon très cher oncle Abdellah** vous avez toujours été présent, merci pour vos bons conseils, votre affection et votre soutien qui m'ont été d'un grand secours au long de ma vie*

A tous les membres de ma famille,

***Frères** : Sissoune « nour » et Salah*

***Sœurs** : Bitita « Nassima », Soumia, Cherifa, Warda, Djamila et Samira*

***Cousins** : Laiche, Mohamed, Lazher, Rachid Et Ahmed ...*

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

A Douady merci pour tes motivations, ton aide, Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous mes amis, à tous mes proches et à tous ceux qui m'aime ...

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Pages
I	Espèces d' <i>Acinetobacter</i> : types de souches et numéro d'accession	3
II	Caractères biochimiques des espèces d' <i>Acinetobacter</i>	6
III	Bêta-lactamases décrites chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
IV	Phénotypes de résistance d' <i>a. Baumannii</i> vis-à-vis des β lactamines	19
V	Bêta-lactamases décrites chez <i>Acinetobacter spp non-baumannii</i>	22
VI	Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez <i>A. Baumannii</i> et substrats préférentiels	24
VII	Séquences d'insertion (IS) chez <i>Acinetobacter spp</i> , origine et Numéro d'accession sur genbank	27
VIII	Répartition des souches isolées selon le sexe	49
IX	Résultats de la formation du biofilm par la technique TM	52
X	Résultats de la formation du biofilm par la technique TCP	53
XI	Résultats de la formation du biofilm selon la nature de prélèvement, le service et la résistance aux antibiotiques	54

Listes des figures

Figure	Titre	Pages
01	<i>A.baumannii</i> sur gélose Trypticase soja	5
02	Etapas de mécanisme de virulence d' <i>Acinetobacter spp</i>	10
03	Diversité de β -lactamases de classe D	18
04	Exemple d'une IS, IS <i>Aba1</i>	26
05	Transposons associés au gène <i>bla</i> _{OXA-23} chez <i>A. baumannii</i> .	28
06	Transposon <i>Tn21</i> un exemple d'un transposon de classe II	28
07	Représentation schématique d'un intégrom	29
08	Structure générale d'un intégrom de classe 1 et mouvement des gènes cassettes	31
09	Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm et visualisation par microscopie à transmission	33
10	Schéma de la structure générale des AHL	38
11	Test d' Hodge modifié	44
12	Disposition des disques d'antibiotiques utilisés pour le test à l'EDTA	45
13	<i>Acinetobacter spp</i> producteur de carbapénèmase	45
14	Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP des souches d' <i>Acinetobacter</i>	46
15	Répartition des <i>Acinetobacter spp</i> selon le service (n=33)	47
16	Répartition des <i>Acinetobacter spp</i> selon la nature du prélèvement	48
17	Proportion des souches isolées à partir des deux sexes	49
18	Répartition des souches étudiées selon les tranches d'âge	50
19	Taux de résistance (I+R) des souches étudiés aux antibiotiques	50
20	Teste à l'EDTA	52
21	Résultats de la formation du biofilm par la technique TM	53
22	Histogramme présente les résultats de la formation de biofilm par la méthode TCP	53

Liste des abréviations

µm : Micromètre

AACs : Aminoglycoside acetyl transferases

ADCs : *Acinetobacter derived cephalosporinases*

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AHL: Les acylhomosérine lactones

AmpC : Céphalosporinase

ANTs : Aminoglycoside nucleotidyltransferases

APHs : Aminoglycoside phosphotransferases

API20NE: Analytical profile index 20NE (NE= non Entérobaceries)

ATCC : American Type Culture Collection

BCP : Bleu de bromocrésol pourpre

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth

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

C1G: Céphalosporine de première génération

C2G: Céphalosporine de deuxième génération

C3G: Céphalosporine de troisième génération

CARB: Carpénémase

CarO : La protéine de membrane externe associée à la résistance aux carbapénèmes

CD : *Cluster of differentiation*

CHDLs : β-lactamases du groupe D (oxacillinase) hydrolysant les carbapénèmes

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CTX-M: Extended-Spectrum β-Lactamase

DR : *Direct Repeat*

ECBU : Etude cyto bactériologique des urines

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic Acid

H₂S : L'hydrogène sulfuré

I : Intermédiaire

IL: Interleukine

IMP: Imipénème

IR : Séquences inversées répétées (*Inverted Repeat*)

IS : Séquences d'insertion

ISAbal1: Insertion sequence *Acinetobacter baumannii* 1

Kb: Kilobase = 1000 pb

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase lactamase)

LCR: Liquide céphalorachidien

LDC: Lysine décarboxylase

LPS: Lipo-polysaccharides

MAPK: Mitogen-activated protein kinases,

MBLs : Métallo- β -lactamases

mm : Millimètre

NDM: New delhi metallo bêta lactamase

NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

ODC: L'ornithine décarboxylase

OmpA : Outer membrane protein A

OXA : Oxacillinase

pb: Paire de bases

PER : *Pseudomonas* extended resistance

PLPs : Protéine liant les pénicillines

QRDR: *Quinolone Resistance-DeterminingRegion*

QS : Quorum sensing

R : Résistant

RND: Resistance-*Nodulation-Division*

S : Sensible

SHV : Sulfhydryl variable

spp : Espèce

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

TLR : Toll-like receptors

Tnp : Transposon

TRI : Phénotype Pénicillinase Résistante aux Inhibiteurs des bêta-lactamases

VEB : Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase

VIM : Venora integron encoded metallo bêta lactamase



Partie Expérimentale

1. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée sur une période de 03 mois, au Laboratoire Central de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Benflis Touhami 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.
- Il se trouve au terrain principal les services : Néphrologie, Hématologie, Réanimation médicale, Biochimie, Immunologie, Toxicologie, CTS + Banque de sang, Microbiologie,
- 1^{er} étage : Ophtalmologie, Traumatologie,
- 2^{ème} étage : Chirurgie (Femme, Homme, Infantile et Urologie),
- 3^{ème} étage : Pédiatrie, Endocrinologie, Cardiologie,
- 4^{ème} étage : Médecine (femme et Homme), Neurologie.

1.1. Le laboratoire de microbiologie

a) Situation géographique

Le Laboratoire Central de Microbiologie du CHU BenflisTouhami de Batna se trouve au terrain principal du CHU (Rez de chaussée). Le service est composé d'un couloir principal abritant les locaux administratifs et les bureaux des médecins. Les locaux sont composés :

- D'un bureau du Professeur Médecin chef de service
- D'un secrétariat et bureau de la surveillante chef service paramédical,
- D'un bureau des maîtres assistants
- D'un bureau des résidents,
- D'une salle de préparation des milieux de culture,
- D'une salle de manipulation qui comporte 4 paillasse érigées en unité :
 - ✓ Une paillasse pour l'examen cytobactériologique des urines,
 - ✓ Une paillasse pour bactériologie générale et hémoculture,
 - ✓ Une paillasse pour l'antibiothérapie
 - ✓ Unité de Tuberculose,
 - ✓ Unité d'urgences bactériologiques.
 - ✓ Unité de séro-immunologie.

b) Le personnel

Le personnel est composé :

- ✓ D'un professeur médecin chef de service,
- ✓ 06 Maîtres assistants,
- ✓ 03 Spécialistes,
- ✓ 08 Résidents (médecins en formation post-graduée),
- ✓ 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 et des biologistes.

2. Souches bactériennes (échantillonnage)

Les souches d'*Acinetobacter spp* qui font l'objet de notre étude, ont été isolées de divers prélèvements durant la période du 01 mars 2013 jusqu'au 31 Mai 2013.

Ces divers prélèvements sont à visé diagnostic colligés au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU Batna. Ces prélèvements provenaient de malades hospitalisés dans différentes services du (CHU) Batna et aussi de patients externes.

a. Nature des échantillons :

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

3. Prélèvements et mise en culture

Les prélèvements sont par la suite acheminés au laboratoire pour être ensemencer sur un milieu ordinaire (Mac Conckey) et incubé à 35°C pendant 24 heures.

Pour les dispositifs médicaux implantés la technique consiste à recueillir l'extrémité du cathéter et de la sonde (4 cm) dans 10 ml de sérum physiologique stérile. Après agitation au vortex ; 0.1ml seraensemencé sur milieu de culture solide ordinaire. Pour les pus, crachats, urine une goutte, ou 0.1ml de ces prélèvements sontensemencés sur le même milieu ordinaire d'isolement.

4. Isolement et purification

Après incubation des milieuxensemencés, on procède, à la purification des colonies bactériennes par ré-isolement sur le même milieu ordinaire (Mac Conkey), c'est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour isoler et cultiver les bactéries à Gram négatif aérobies facultatives. L'action sélective de ce milieu est attribuée à la présence de cristal violet et de sels biliaires (Mac Conkey) qui inhibe les bactéries à Gram positif. Le caractère différentiel de ce milieu est attribué au lactose qui peut être dégradé ce qui donne des colonies roses, les colonies d'*Acinetobacter* doivent apparaître rondes, blanches, muqueuses et de taille moyenne.

5. Identification

L'identification d'*Acinetobacter* se fait sur la base de caractères morphologiques, culturels, et biochimiques par la galerie classique et la galerie API 20NE (bio-Mérieux) (Voir annexe 01).

6. Etude de la résistance aux antibiotiques

6.1. L'antibiogramme (Voir annexe 02)

La technique consiste à déposer à la surface de la gélose préalablementensemencée à l'écouvillon avec une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland, des disques imprégnés des différents antibiotiques ; Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition dont le diamètre est mesuré afin de déterminer la sensibilité de la souche à l'antibiotique en question [136].

Les antibiotiques sont testés sont : Ticarcilline (TC), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PRL), Pipéracilline + tazobactam (TZP), cefépime (FEP), Imipénème (IMP), Ceftazidime (CAZ), Azteonam (ATM), Tobramycine (TBM), Amikacine (AK), Gentamicine (GN), Kanamycine (K), Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole (SXT), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CT) [136].

6.2. Tests complémentaires

6.2.1. Recherche de métallo- β -lactamase (M β L) (Voir annexe 03)

6.2.1.1. Test de Hodge modifié

Le test de Hodge est un test phénotypique initialement mis au point pour permettre la détection de pénicillinases la version modifiée consiste à mettre un disque d'imipénème dans le milieu d'une boîte de gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage d'une dilution 1/10 de la suspension de l'organisme indicateur de *E. coli* ATCC 25922, ajustée à une turbidité équivalente à 0.5 Mc Farland, en suite la souche teste et les deux autres souches témoins positive et négative sont strié radialement à partir du bord du disque jusqu'à la périphérie de la boîte (**Figure 11**) [137,138]



Figure 11 : Test de Hodge modifié : st souche teste ; t- témoin- ; t+ témoin

6.2.1.2. Le test d'EDTA

Basé sur l'inhibition de l'activité des différentes carbapénémases par l'EDTA, en effet les métallo- β -lactamases comportent au niveau de leur site actif un ion zinc essentiel à leur activité, d'où l'effet inhibiteur d'agents chélateurs de cations divalents comme l'EDTA. Trois disques (IMP, IMP+ 4 μ L EDTA, 4 μ L EDTA) sont déposés sur une gélose Muller Hinton a préalablement été ensemencée par écouvillonnage d'une suspension de DO = 0.5 Mc Farland de la souche a testé (**Figure 12**) [136].

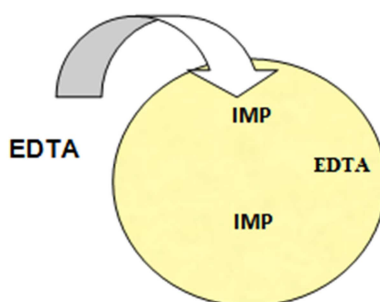


Figure 12 : Disposition des disques d'antibiotiques utilisés pour le test à l'EDTA

Après 18 heures d'incubation, les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA était supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul sont considérées comme souches productrices de métallob- β -lactamase (**Figure 13**).

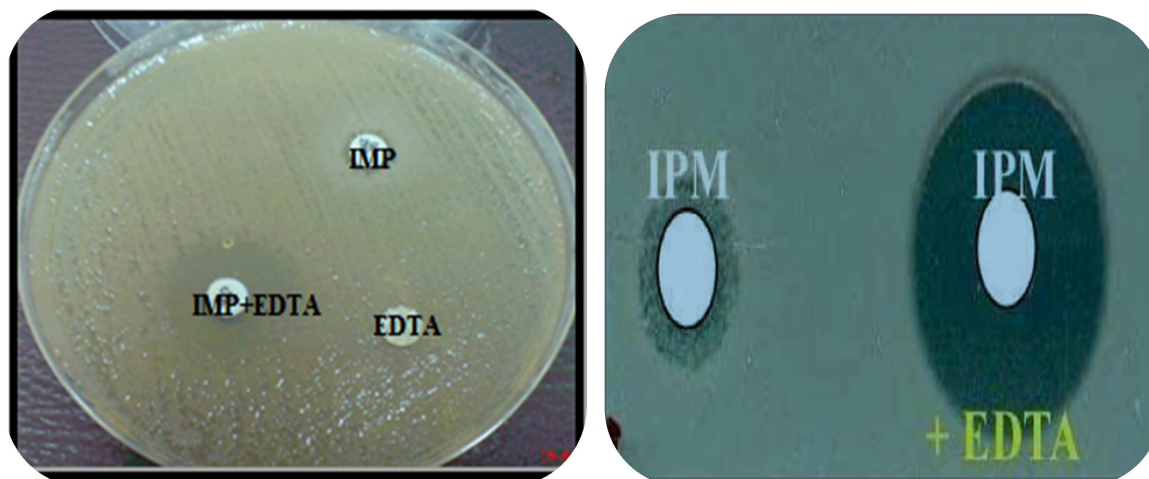


Figure 13: *Acinetobacter* spp producteur de carbapénèmase

7. Evaluation de la formation du biofilm (Voir Annexe 04)

On a utilisée deux méthodes à savoir :

7.1. La méthode tube (TM) [139]

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.*, 1982 [139]. Elle est basée sur la capacité des bactéries d'adhérer à la surface interne des tubes.

A partir d'une boîte de culture de 24h, ensemencer une colonie dans 10 ml de bouillon BHIB supplémenté de 2% de saccharose, après 24h incubation à 37°C les tubes sont rincé avec le tampon phosphate salin PBS et coloré avec le cristal violet (0,1%), les souches sont classées en 0 pour absent, + pour faible, ++ pour modéré et +++ pour fort. (Voir Annexe)

7.2. La méthode de Plaque de culture de tissus (TCP) [139,140] (Voir Annexe 04)

Tous les isolats sont criblés pour leur aptitude de former un biofilm par la méthode TCP comme décrit par Christensen *et al.*, [139]

Une colonie est inoculée dans 10 ml du BHIB additionné de 2 % de saccharose, après 18 h d'incubation les microplaques ont été remplis avec 0,2 ml du milieu dilué en 1/100 avec du BHIB frais après incubé 18h à 37°C elles sont rincées quatre fois avec le tampon phosphate salin PBS, fixées avec l'acétate de sodium (0.2%) et colorées avec le cristal violet (0,1%) (**Figure 14**).

Les DO des biofilms ont été lus avec un lecteur microplaque standard (Biotek Instruments® ELX 800) à une longueur d'onde 570 nm. Les résultats sont interprétés en trois catégories : non adhérents, densité optique égale ou inférieure à 0.111 ; faiblement adhérents, la densité optique de 0.111 à 0.222 ; fortement adhérents, la densité optique est supérieure à 0.222.

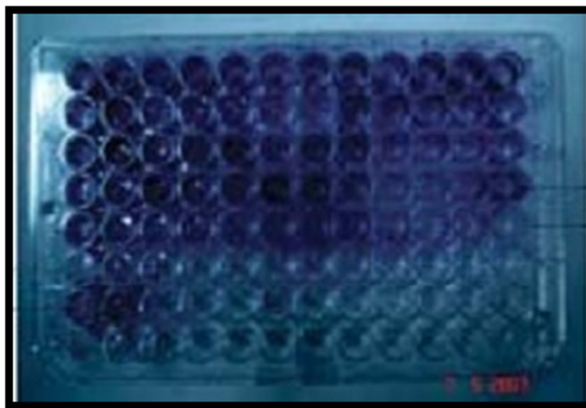


Figure 14. Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP des souches d'*Acinetobacter*



Introduction

Introduction

Acinetobacter est un coccobacille à Gram négatif immobile « comme son nom l'indique », largement répandu dans la nature (le sol et l'eau) ainsi que chez l'animal et dans l'alimentation (produits laitiers, viandes...), ils sont capables d'utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie, ce qui leur permet de coloniser plusieurs types de niches écologique et de persister dans un environnement hostile (matériel de ventilation, flacons de perfusion ...etc.)

Il est très connu par son implication dans les différents types d'infections nosocomiales, par sa grande capacité d'acquérir des résistances à toutes les familles d'antibiotiques et par son aptitude de coloniser les différentes surfaces par la formation des biofilm [1].

Le choix de ce thème est basé sur le fait de la détection d'une multitude de cas d'*Acinetobacter* toto-résistant, au niveau de CHU de Batna et dans le but d'établir le profil de résistance des souches isolées et d'évaluer leur aptitude de former un biofilm

Notre travail est organisé en deux parties : Une première partie **bibliographique** où seront rappelées des généralités sur le genre *Acinetobacter* et sur ces mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi que sur la notion de la formation de biofilm, et la seconde, **pratique**, expose la démarche expérimentale suivie afin de répondre aux objectifs de ce travail.

1. Historique et taxonomie

La taxonomie du genre *Acinetobacter* a subi un développement intensif car plusieurs souches ont été isolées indépendamment par de nombreux auteurs et placées dans divers genres, Actuellement, le genre comprend 23 espèces dont les noms valides et 11 espèces génomiques décrites par les techniques d'hybridation ADN-ADN [1, 2, 3].

Les premières souches du genre *Acinetobacter* ont été isolées à partir du sol par le microbiologiste néerlandais Beijerinck en 1911 et les a dénommé *Micrococcus calcoaceticus* [4], un organisme très similaire a été décrit par Henriksen en 1937 sous le nom de *Alcaligenes haemolysans* [5], 03 ans plus tard Audureau isola un autre organisme très similaire aux autres et qui est fort probablement le même sous le nom de *Moraxella Iwoffi* [6,7].

En 1948 cette bactérie a été identifiée à partir d'un prélèvement clinique (urines) par Schaub et Hauber et la place dans le genre *Bacterium* « *Bacterium unitratum* » qui a été réservé pour les organismes qui ne sont pas encore attribués à l'un des genres reconnus [8], La même bactérie sous le nom de *Moraxella Iwoffi* var. *glucidolytica* [9] puis remplacé par *Moraxella glucidolytica* [10].

En 1953 Brisou propose d'inclure *B. anitratum* dans genre *Achromobacter* avec la nomenclature *Achromobacter anitratum* [11], C'est en 1954 que Brisou et Prévot proposent la désignation du genre *Acinetobacter* (du grec *akinetos* : incapable de bouger) pour regrouper les espèces des achromobactéries de la tribu des *Achromobactereae* immobiles [12].

En 1957, Brisou désigne *Acinetobacter anitratum* comme espèce de référence pour ce nouveau genre, 04 ans plus tard en 1961, Prévot décrit 18 espèces. Dans son édition de 1974, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* listait le genre *Acinetobacter* avec la description d'une seule espèce : *Acinetobacter calcoaceticus* [13].

Une avancée majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en 1986 grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de Bouvet et Grimont qui sont parvenus à distinguer 12 espèces génomiques, certaines étant clairement dénommées *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter Iwoffi* comme *A. baumannii* (Tableau I) [13], ce dernier qui est actuellement très fréquemment isolé dans l'environnement hospitalier [14,15] d'autres travaux réalisés par la suite ont abouti à la description de nombreux autres espèces [16,17,18], plus récemment, d'autres espèces bactériennes ont été décrites chez l'homme comme *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter schindlerii* et *Acinetobacter ursingii* [19] et 07 autres

dans l'environnement (boue) décrites par Carr et ses collaborateurs en 2003 dont *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter grimontii*, *Acinetobacter tjernbergiae*. (**Tableau I**) [20], Tout dernièrement entre 2008 et 2011, de nouvelles espèces d'*Acinetobacter* ont été décrites et qui ont une relation avec la pathologie humaine et d'autres non pathogènes isolés de l'environnement.

Tableau I : Espèces d'*Acinetobacter* : types de souches et numéro d'accèsion [22].

Espèce	Type de souches	Numéro d'accèsion <i>rpoB</i> GenBank
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 1)	B46= CIP 81.8 = ATCC 23055 = DSM 30006 = LMG 1046T = CCUG 12804 = NCCB 22016 = NIPH 2245 = RUH 2201	DQ207474, EF611388, EU477149
<i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 2)	CIP 70.34T = ATCC 19606T = DSM 30007 = LMG 1041 = CCUG 19096 = NCCB 85021 = NIPH 501 = RUH 3023	DQ207471, EF611384, EU477108
<i>Acinetobacter pittii</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 3)	CIP 70.29, ATCC 19004, LMG 1035, NIPH 519, RUH 2206	EU477114
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 4)	B40, CIP 64.3, ATCC 17906, DSM 6962, LMG996, CCUG 888, NCCB 85026, NIPH 510, LUH 9705, CCM 2358	DQ207484, EU477109, EF611391
<i>Acinetobacter junii</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 5 and <i>Acinetobacter grimontii</i>)	B10, CIP 64.5, ATCC 17908, DSM 6964, LMG 998, CCUG 889, RUH 2228, NIPH 551, CCM 2376	DQ207486, EU477110, EF611394
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 6	CIP A165, ATCC 17979, LMG 1026, CCUG 26492, NIPH 520, RUH 2867	DQ207480, EU477115
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 7)	B8, CIP 64.6, ATCC 17909, DSM 6963, LMG 999, CCUG 19095, NIPH 518, RUH 2231	DQ207485, EU477113
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 8 and <i>Acinetobacter</i> gen. sp. 9)	CCUG 12805, NCCB 83025, NIPH 512, CCM 5581, RUH 2219	DQ060363
<i>Acinetobacter berezinae</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 10)	CIP 70.12, ATCC 17924, LMG 1003, CCUG 26493, NCCB 82031, NIPH 521, RUH 2224	DQ207475, EU477116
<i>Acinetobacter guillouiae</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 11)	B94, CIP 63.46, ATCC 11171, DSM 590, LMG 988, CCUG 2491, NCIB 8250, NIPH 522	DQ207476, EU477117
<i>Acinetobacter radioresistens</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 12)	FQ-1, IAM 13186, CIP 103788, ATCC 43998, DSM 6976, LMG 10613, CCUG 56440, NIPH 513, RUH 2865, CCM 3588	DQ207489, EU477112, EF611400
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 13BJ (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14TU)	CIP 64.2, ATCC 17905, LMG 995, CCUG 887, NIPH 1860, RUH 2218, LUH 9704	DQ207478, EU477149
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 14BJ	Bouvet 513, CCUG 14816, NIPH 2112, LUH 1726	EU477147
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 15BJ	SEIP 23.78, CCUG 26494, NIPH 1866, LUH 1729	EU477133
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 16	CIP 70.18, ATCC 17988, LMG 1031, CCUG 996, NIPH 1872	DQ207477, EU477135
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 17	Bouvet 942, SEIP Ac87.314, CCUG 34437, NIPH 1867, LUH 1736	EU477134

<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 13TU)	CIP 70.11, ATCC 17903, DSM 30010, LMG 993, CCUG 26488, NIPH 523, RUH 2210	EU477118
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 15TU	M 151a, CCUG 26390, NIPH 546, LUH 1090	EU477119
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'entre 1 and 3'	Gerner-Smidt 10095, CCUG 34786, NIPH 817, LUH1469	EU477122
<i>Acinetobacter</i> gen. sp. 'proche de to 13TU'	Gerner-Smidt 10090, CCUG 34785, NIPH 973, LUH1472	EU477126
<i>Acinetobacter venetianus</i>	RAG-1, ATCC 31012, LMG 19082, CCUG 45561, NIPH 1925, LUH 3904	EU477136
<i>Acinetobacter ursingii</i> (<i>Acinetobactersepticus</i>)	CIP 107286, ATCC BAA-617 DSM 16037, LMG19575, NCCB 100021, CCUG 45559, NIPH 137, LUH 3792	DQ231239, EF611406, EU477105
<i>Acinetobacter schindleri</i>	CIP 107287, ATCC BAA-618, DSM 16038, LMG 19576, NCCB 100022, CCUG 45560, NIPH 1034, LUH 5832	DQ207490, EU477128, EF611402
<i>Acinetobacter parvus</i>	CIP 108168T, DSM 16617T, LMG 21765T, CCUG 48800T, NIPH 384T, LUH 4616T	DQ207488, EU477107, EF611399
<i>Acinetobacter baylyif</i> <i>Acinetobacter bouvetii</i>	4B02, CIP 107468, DSM 14964, CCUG 50766, NIPH 2281, CCM 7196	EU477155, CR543861 DQ207473, EU477150, EF611387
<i>Acinetobacter townneri</i>	AB1110, CIP 107472, DSM 14962, CCUG 50769, NIPH 2286, CCM 7201	DQ207493, EU477154, EF611405
<i>Acinetobacter tandoii</i>	4N13, CIP 107469, DSM 14970, CCUG 56317, NIPH 2284, CCM 7199	DQ207491, EU477152 , EF611403
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	7N16, CIP 107465, DSM 14971, CCUG 50768, NIPH 2285, CCM 7200	DQ207492, EU477153, EF611404
<i>Acinetobacter gernerii</i>	9A01, CIP 107464, DSM 14967, CCUG 56316, NIPH 2282, CCM 7197	DQ207482, EU477151, EF611389
<i>Acinetobacter soli</i>	B1, CCUG 59023, KCTC 22184, JCM 15062	No déterminé
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> <i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	CCUG 51249, NIPH 838, LUH 4759 CCUG 51248, NIPH 2150, RUH 422	EU477124 EU477148

2. Caractéristiques

2.1 Morphologie

Les souches du genre *Acinetobacter* sont constituées de bactéries à Gram négatif, ils ont une morphologie caractéristique de diplobacilles à extrémités arrondies avec des formes en majorité coccoïdes [23], ce genre de bactéries peut résister partiellement à la décoloration par l'alcool. C'est pourquoi il peut être considéré comme à Gram variable [24].

Comme leur nom l'indique sont immobiles ils sont aussi non sporulées. La présence de la capsule est facultative, 30 % des souches *A.baumannii* sont capsulées [25], les démontions de cette bactérie varie de 0,9 à 1,6 µm de diamètre sur 1,5 à 2,5 µm de longueur.

2.2 Culture

La culture des espèces du genre *Acinetobacter* est possible sur la plupart des milieux utilisés en routine au laboratoire de microbiologie. *Acinetobacter* se développe en aérobiose sur des milieux d'usage courant (gélose nutritive, gélose trypticase soja, gélose cœur-cerveille). Des milieux sélectifs permettant une orientation du diagnostic peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des bactéries associées (BCP, Mac-Conkey,...), les colonies d'*Acinetobacter* sur un milieu solide sont bombées à bordure régulière de forme lisse avec une pigmentation jaune parfois mucoïde, pâle au blanc grisâtre de taille environ 02 mm, bien que certaines souches environnementales qui produisent un pigment brun diffusible ont été décrites (**Figure 1**) [14].



Figure 1: *Acinetobacter baumannii* sur gélose Trypticase soja, l'aspect muqueux ou (smooth) des colonies

2.3. Caractères biochimique

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bacilles aérobies stricts, catalase-positifs et oxydase-négatifs, non fermentants. Les tests biochimiques habituels pour le genre *Acinetobacter spp.* sont en majorité négatifs : nitrate réductase, LDC et ODC négatifs, H₂S et indole négatifs ils ont été déterminés par Gerner-Smith et al en 1991 (**Tableau II**) [26], l'identification est facile pour toutes les souches d'*Acinetobacter* au rang de genre mais pas au rang d'espèce. Pour cela une galerie Api 20NE peut être utilisée

pour faciliter l'identification, le tableau résume les différents caractères d'identification biochimiques des espèces d'*Acinetobacter*

Tableau II : Caractères biochimiques des espèces d'*Acinetobacter* [3].

	Gen. sp. 3	Gen. sp. I313TU	<i>A. baumannii</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	Between I and ..	'Close to I3TU	<i>A. baylyi</i>	<i>A. bereziniae</i>	<i>A. bouvetii</i>	<i>A. gerneri</i>	<i>A. guilloniae</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. twoffii</i>	<i>A. parvus</i>	<i>A. radioresistens</i>	<i>A. schindleri</i>	<i>A. tandoii</i>	<i>A. townneri</i>	<i>A. ursingii</i>	Gen. sp. I5TU	
Croissance a																						
44																						
41																						
37																						
Acidification de D-glucose	95	+	+	91	+	+	+	V+	-	+	-	-	-	v-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilisation de trans-Aconitate	+	60	9	+	+	+	+	V	-	-	v-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Adipate	+	95	8	+	+	50	+	V	-	+	+	-	-	V+	-	+	V	-	-	+	v	v
β-Alanine	90	85	+	91	+	50	-	+	-	+	V+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Aminobutyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V+	V	V	V+	-	+	-	+	-	-	-	v
L-Arabinose	85	+	8	27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-Aspartate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	V	-	-	-	-	+	-	-	V+	-
Azelate	+	95	8	+	+	50	+	V	-	+	+	-	-	+	-	+	V	-	-	+	+	+
Benzoate	90	90	8	+	+	+	+	+	+	+	V+	+	V+	-	+	V+	+	+	+	V	+	+
2,3-Butanediol	85	90	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	-	-	+	V	+	V	-	+	+
Citraconate	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate de Simmons	+	+	+	91	+	+	+	+	+	+	+	V	V	v-	-	-	V	+	-	+	-	-
Ethanol	+	+	9	91	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	V+	+	+	+	+	+
Gentisate	25	10	4	-	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-
D-Gluconate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+	ND	+	V	+	V	V
Glutarate	90	95	9	91	+	+	V	+	+	+	+	-	-	-	-	+	V+	-	-	V+	-	-
Histamine	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	+	+	9	+	+	+	-	V+	+	-	V+	-	V	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4-Hydroxybenzoate	+	80	9	91	+	+	+	V+	-	+	V+	v-	-	-	-	-	V	+	-	V+	-	-
DL-Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v
L-Leucine	95	95	8	91	+	50	-	-	-	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Levulinate	5	5	2	91	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Malate	95	+	9	D	+	+	D	V+	-	-	+	-	V	v-	-	-	V+	+	v	V+	v	v
Malonate	95	20	8	+	+	+	+	-	-	-	V	V	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-Ornithine	95	95	7	+	+	50	-	-	-	-	-	v-	-	-	V	-	-	+	-	-	-	-
Phenylacetate	75	85	8	+	+	+	-	V	-	+	V	-	-	V+	-	+	-	+	-	-	-	+
L-Phenylalanine	75	85	8	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-
Putrescine	+	95	9	+	+	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-
D-Ribose	35	80	7	45	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L-Tartrate	85	-	3	9	5	52	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V	+	-	-	-
Tricarballoylate	+	95	2	9	+	+	V	V	-	-	V	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-
Trigonelline	20	20	2	6	9	5	-	+	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0	0		0															

(+): tous les souches positif ; (numéros) : les pourcentages des souches positives ; (-) : toutes les souches négatives

V : 16-84% souches sont positives ; (v+) :85-99% des souches positives ; (v-) : 1-15% des souches positives

(D) : réactions douteuses dans la plupart des souches ; (ND) : non déterminé

3. Habitat et transmission

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont ubiquitaires elles sont fréquemment isolée du sol, de la surface de l'eau, végétaux [20,27], il peut aussi être un agent de contamination de différents aliments [28], surtout les légumes et les fruits.

Les espèces *Acinetobacter* sont apparemment le seul groupe de bactéries à Gram négatif qui peut appartenir à la flore normale de la peau humaine [30], donc elle être un réservoir naturel et une source probable d'infections endogènes [29,30] plus particulièrement chez des sujets dont les défenses immunitaires sont altères ou peuvent être transposées aux malades admis dans les différents services d'hospitalisations par le personale ou les visiteurs, des études ont signalé la présence des taux très élevés d'*Acinetobacter* dans le milieu hospitalier dont ils représente 88% des souches multirésistantes d'*Acinetobacter* [31].

Plusieurs souches qui appartiennes à ce genre sont capables de se regrouper et former des biofilms ce qui leur permet de survivre dans différents environnements et d'adhérer à plusieurs types de surfaces abiotiques ce qui explique leur isolement du matériels médicales, le biofilm leur confère une tolérance aux conditions de l'environnement [32,33].

4. La colonisation de peau et du tractus gastro-intestinal par *Acinetobacter spp*

Une étude épidémiologique menée en Allemagne en 1997 a révélé que la peau humaine peut être colonisée par plusieurs espèces d'*Acinetobacter* dont les colonisateurs majoritaires sont *Acinetobacter lwoffii* (47%), *Acinetobacter johnsonii* (21%), et *Acinetobacter radioresistens* (12%) [34]. En revanche *A. baumannii* qui a une très grande importance clinique a été moins fréquemment isolé (0.5 %) avec l'espèce *Acinetobacter nosocomialis* (1%) [34], après deux ans une autre étude a confirmé que l'espèce la plus fréquemment isolée de la peau des sujets sains *Acinetobacter lwoffii* [35].

Une étude plus récente sur des échantillons de la matière fécale des personnes non hospitalisées a conclu que parmi les *Acinetobacter* isolé *A. johnsonii* représente 17,5 %, suivie par *A. guillouiae*, alors *A.baumannii* représente seulement 0,8% ce qui signifié que l'intestin n'est pas un réservoir communautaire important d'*A.baumannii* [36].

5. Pouvoir pathogène et facteurs de risques

Acinetobacter est un pathogène opportuniste qui affecte presque exclusivement les personnes prédisposées, à savoir, les patients gravement malades, y compris qui sont admis en unités de soins intensifs, les patients lourdement traumatisés, ainsi que des nouveau-nés hospitalisés [14, 38, 39]. Il peut causer divers types d'infections, y compris les pneumonies, les infections urinaires, les bactériémies, les infections des plaies et les méningites. Ces infections sont principalement causées par *A. baumannii* bien que *A. pittii* et *A. nosocomialis* peuvent être aussi impliqués ainsi que d'autres espèces, le séjour prolongé à l'hôpital et l'utilisation abusif des antibiotiques ont été identifiés comme étant des facteurs de risque des infections à *Acinetobacter*. En outre, les dispositifs médicaux invasifs, tels que des tubes, cathéters et dispositifs vasculaires peuvent agir comme portes d'entrée pour les espèces *Acinetobacter* [40].

6. Etapes de mécanisme de virulence

6.1. Adhérence

Adhésion à des cellules hôtes est une première étape importante dans la pathogénèse des bactéries [41]. Cependant, il existe relativement peu d'informations sur les mécanismes par lesquels *Acinetobacter* se lie et interagit avec les cellules hôtes [42], il a été démontré avec des études *in vitro* que les souches d'*Acinetobacter* pourraient adhérer aux cellules épithéliales humaines [43].

Des facteurs spécifiques tels que les adhésines et d'autre non spécifiques tels que la surface hydrophobe [46] jouent un rôle important comme des facteurs adhérence, les andésines sont de deux types adhésines fimbriae et les adhésines non- fimbriae [44], divers types d'adhésines fimbriae ont été décrites chez *A.baumannii* y compris les pili minces qui lui permet adhérer à la surface de la cellules hôte (**Figure 2**) [45] .

En plus des adhésines fimbriae *Acinetobacter* peut exprimer une famille d'adhésines à la surface cellulaire (adhésines non- fimbriae) qui reconnaissent spécifiquement et composants de liaison dans la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène et le fibrinogène [42].

Il a été montré que la surface cellulaire des isolats cliniques d'*A.baumannii* est plus hydrophobe que celle des souches de l'environnement ou les souches isolées à partir des sujets sains [46].

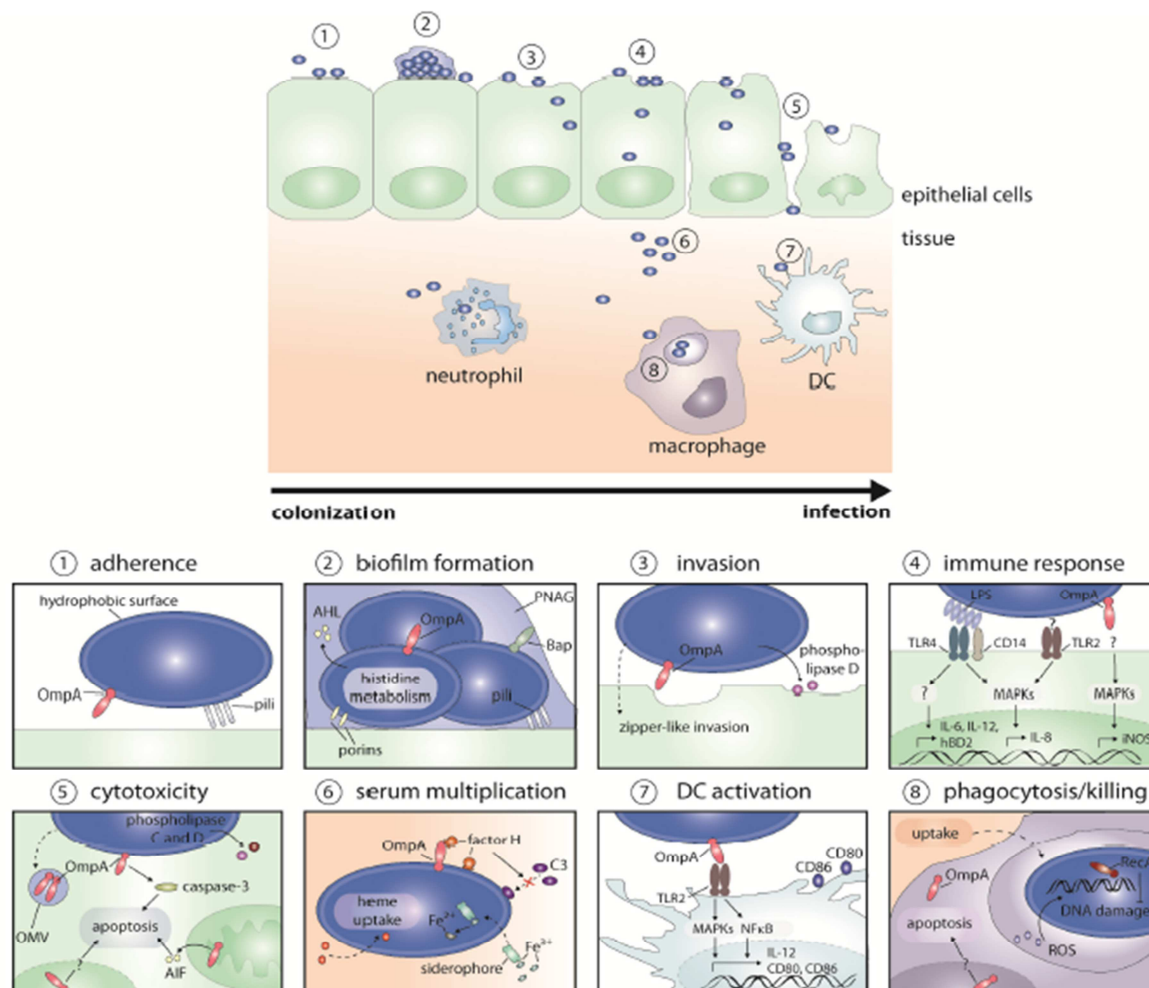


Figure 2 : Les étapes de mécanisme de virulence d'*Acinetobacter spp* [47]

Les bactéries peuvent adhérer à la surface de leur hôte (1) par l'intermédiaire des adhésines et des facteurs non-spécifiques. Ils se multiplient, forment des microcolonies et produisent exopolysaccharides conduisant à la formation d'un biofilm (2), *Quorum sensing*, le métabolisme de l'histidine, les pili et les protéines spécifiques de la membrane externe jouent un rôle dans ce processus. Une fois fixées, les bactéries peuvent envahir l'hôte par l'intermédiaire d'un mécanisme de type glissière « *zipper-like mechanism* » ou par la sécrétion de plusieurs enzymes qui dégradent les molécules de la cellule hôte permettant l'invasion des tissus sous-jacents (3). Tels agents toxiques (les enzymes) produits par les bactéries peuvent, soit directement, soit par l'intermédiaire de vésicules de membrane

externe, être transférés aux cellules hôtes conduisant à l'apoptose (5). Les cellules hôtes peuvent détecter les bactéries via des récepteurs spécifiques de reconnaissance de formes, ce qui déclenche la réponse immunitaire innée (4). Une fois à l'intérieur de l'hôte, les bactéries activent les cellules dendritiques (7), qui par la suite active la réponse immunitaire adaptative, Les neutrophiles et les macrophages qui résident dans les tissus ou circulent dans le sang peuvent phagocyter et détruire les bactéries envahisseurs (8). Cependant, les bactéries peuvent échapper à ces mécanismes de défenses par plusieurs mécanismes tels que l'induction de l'apoptose des cellules hôtes. La capacité *Acinetobacter* à se soustraire aux actions du complément et la capacité d'acquérir le fer par l'intermédiaire de sidérophores lui permette la survie et la multiplication à l'intérieure de l'hôte (6).

6.2. *Quorum sensing* et formation du biofilm

Afin de construire une communauté de biofilm très structurée et complexe, les bactéries doivent communiquer entre eux par l'intermédiaire d'un processus appelé *quorum sensing* [48,49]. Le biofilm permet aux souches d'*Acinetobacter* de coloniser l'hôte et de résister au système immunitaire ainsi qu'aux antibiotiques (**Voir chapitre 3**).

6.3. Invasion

Une fois adhéree sur la surface de l'hôte, *Acinetobacter* peut avoir accès à l'hôte par un processus appelé invasion. A cet effet, il peut sécréter plusieurs enzymes qui dégradent les molécules de la cellule hôte pour lui permettre de diffuser dans l'hôte tout en évitant absorption par les cellules-hôtes, ce qu'on appelle invasion extracellulaire. L'invasion intracellulaire se produit lorsqu'il pénètre réellement dans les cellules hôtes par deux mécanismes: un mécanisme à fermeture éclair et un mécanisme de déclenchement, qui ont d'abord été classé en fonction des différences morphologiques. Le mécanisme de fermeture éclair (entrée médiée par récepteur) nécessite l'interaction directe des ligands bactériens avec des récepteurs de la surface cellulaire de l'hôte et implique le réarrangement local du cytosquelette sur le site de l'invasion. En revanche, le mécanisme de déclenchement est initié par l'injection protéines effectrices bactériennes qui sont délivrées un système de sécrétion de type III. Les protéines effectrices régulent la dynamique et induisent des réarrangements du cytosquelette [43].

Il a été montré que les cellules épithéliales bronchiques sont le type cellulaire le plus sensible aux infections par *Acinetobacter spp.* La protéine OmpA joue un rôle essentiel dans l'invasion de ces cellules par *A. baumannii* ATCC19606T et elle est

impliquée dans la diffusion de cette souche dans la circulation sanguine dans un modèle étude de pneumonie chez la souris, d'autres facteurs sont impliqués dans le processus de l'invasion à savoir la sécrétion d'enzymes tels que les lipases et les hémolysines [47] l'invasion bactérienne, induit également la cytotoxicité comme décrit ci-dessous.

6.4. Induction de la réponse inflammatoire

Le LPS est considéré comme un puissant stimulateur de la réponse inflammatoire chez l'hôte, sa structure est associée à une grande capacité de l'induction de la sécrétion des cytokines [50,51], les récepteurs CD14 et TLR4 jouent un rôle clé dans la détection innée d'*Acinetobacter* par la fraction LPS, ce qui entraîne l'élimination efficace des bactéries au niveau du poumon, tandis que le TLR2 semble réduit la puissance de la réponse inflammatoire pendant la pneumonie aiguë à *A.baumannii* [49], l'interaction d'*A.baumannii* avec TLR2 et TLR4 active l'expression de IL-8 suite à l'activation de NF- κ B, et la MAPK p38 et p44/42, OmpA est un autre facteur immunomodulateur de *A. baumannii* associée à l'activation et la maturation des cellules dendritiques qui entraînent la différenciation des cellules T vers une réponse de type lymphocyte T auxiliaire 1 [52].

L'IL-8 joue un rôle important dans le recrutement et l'activation des neutrophiles [49]. Les expérimentations animales ont montré que le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires des souris infectées est essentielle pour l'élimination de l'*A. baumannii* des poumons, d'autre part des études cliniques ont montré que *A. baumannii* est un isolat fréquent chez les sujets neutropéniques [54].

6.5. Cytotoxicité

Bien qu'il n'ait été pas décrit qu'*Acinetobacter spp* peut produire des toxines spécifiques, il a été montré que les souches de ce genre peuvent être toxiques pour les cellules épithéliales surtout des voies respiratoires et les macrophages, avec la protéine OmpA qu'est impliquée dans l'induction de l'apoptose une étude a montré que l'Omp38 purifiée d'*A. baumannii* pénètre dans la cellule et elle est localisée au niveau de la mitochondrie ce qui provoque la libération des molécules pro-apoptique tels que le cytochrome C et AIF, Cet événement active la caspase-3, qui a été suivie par la dégradation de l'ADN en des fragments d'environ 180 pb de taille, ce qui est caractéristique de l'apoptose cellulaire, d'autre part, AIF active l'apoptose caspases-indépendante et dégrade l'ADN chromosomique en des fragments de 50 Kb, ce qui aboutit à la fragmentation à grande échelle de l'ADN [55], les résultats de cette étude ont une grande importance de

l'OmpA dans le processus apoptique induite par *Acinetobacter* bien que le mécanisme précis reste à élucider.

6.6. Acquisition de fer

Le fer est un élément essentiel pour pratiquement toutes formes de vie comme, La capacité d'obtenir du fer à partir de l'hôte est essentielle pour la survie des micro-organismes. Les micro-organismes ont besoin de fer pour une variété de processus métaboliques, cependant. La grande majorité du fer chez l'hôte vertébré se lie à des protéines tels que la ferritine, la transferrine et la lactoferrine ce qui limite son taux sérique et tissulaire, une des stratégies développée par les micro-organismes pour s'adapter à ces condition est la sécrétion des molécules de faible poids moléculaire appelés sidérophores dont le rôle est de récupérer du fer à partir de l'environnement et qui peuvent être considéré comme un facteur de virulence dans un environnement limité en fer [56, 57]

Plusieurs études ont montré que des souches d'*Acinetobacter* ont la capacité de croître dans des conditions de carence en fer libre est très limité, par la sécrétion de l'acinetobactin, un composé phénolique qui a montré une activité de sidérophores *in vitro* [55,56], après son liaison au fer est reconnue par un récepteur bactérien de surface nommé BauA [59]. D'autre part des systèmes d'absorption fer ferreux, ont été décrits [47]. L'utilisation de défiant systèmes acquisition fer indique que c'est important facteur de virulence qui permet la survie d'*Acinetobacter spp* dans l'hôte

6.7. La multiplication dans le sang

Pour se reproduire dans le sang et amorcé une bactériémie, *Acinetobacter* doit résister aux différents mécanismes de défense de l'homme, il a été décrété que certaines souches *A. baumannii* peuvent résister à l'action du complément qu'est au centre de la défense immunitaire innée contre l'invasion bactériennes du sang, OmpA joue un rôle important dans cette résistance par liaison du facteur H du complément, empêchant ainsi la voie alterne du complément [61], un autre facteur semble assez important pour la survie d'*Acinetobacter* dans c'est la phospholipase D, il a été décrété que son inhibition diminue significativement la capacité d'*A. baumannii* de se multiplier dans le sérum mais le mécanisme moléculaires mis en jeu reste à élucider [61].

7. Exemples des manifestations cliniques provoquées par *Acinetobacter*

7.1. Pneumopathies

La pneumonie associée à la ventilation causée par différentes espèces d'*Acinetobacter* peut présenter des défis majeurs pour les médecins elle est généralement contractée dans les unités de soins intensifs [62].

7.2. Septicémies

Acinetobacter baumannii est une des principales causes de la septicémie des patients hospitalisés en soins intensifs avec des taux de mortalité très élevée [63], d'autres espèces peuvent être aussi en cause à savoir *A. calcoaceticus* et *A. junii* [64,65], Les septicémies nosocomiales représentent les infections les plus graves parmi les infections à *Acinetobacter* elles surviennent surtout chez les patient dont les défenses immunitaire sont altères [65,66].

7.3. Méningite

Les méningites à *Acinetobacter* peuvent survenir après un acte de neurochirurgie, un traumatisme crânien ou infection métastatique chez les patients bactériémiques [67]. Elles causent des taux de mortalité qui varie de 15 à 71%, un taux de 40 % chez les nouveau-nés.



Chapitre II

1. La résistance aux antibiotiques

1.1. Phénotype sauvage

Les souches d'*A. baumannii* sont naturellement résistantes à la pénicilline G, à l'amoxicilline et aux céphalosporines de première et deuxième générations. Dans les années 70, date des premiers travaux consacrés à *A. baumannii*, celui-ci était décrit comme sensible à tous les antibiotiques alors commercialisés à l'exception de la pénicilline. L'analyse du génome de cette bactérie a modifié le point de vue du bactériologiste. En effet, *Acinetobacter* possède dans son génome un gène codant pour la production d'une bêta-lactamase cette notion a été d'abord proposée par Matthew et Harris [68], par la suite elle a été identifiée chez plusieurs espèces d'*Acinetobacter* et comme appartenant au type céphalosporinase [69, 70,71].

Bien qu'il y ait eu des controverses, à la différence des espèces d'entérobactéries du groupe 3 et de *Pseudomonas aeruginosa*, cette enzyme n'est pas inductible en raison de l'absence d'un régulateur en amont du gène *bla_{ampC}* [72]. Plusieurs types de céphalosporinases ont été caractérisés chez *A. baumannii*. Elles sont maintenant appelées aujourd'hui ADC (*Acinetobacter*-derived-cephalosporinase) et sont à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à céfalotine et la céfoxitine chez l'espèce *A. baumannii*. Comme les autres enzymes de la classe C, elle n'est pas sensible aux inhibiteurs de Bêta-lactamase comme l'acide clavulanique. Outre cette céphalosporinase, *A. baumannii* possède un gène codant une enzyme de classe D ou oxacillinase chromosomique naturelle OXA-51, identifiée comme ubiquitaire dans l'espèce *baumannii* et utilisée comme marqueur d'identification d'espèce. Il existe des variants d'OXA-51 comme OXA-69 et OXA-66. Le rôle de ces enzymes dans l'expression de la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui très faible voire inexistant. Comme *P. aeruginosa*, *A. baumannii* dispose d'un nombre de porines inférieur à celles retrouvées chez *E. coli* et, de ce fait, présente une imperméabilité naturelle. Cette imperméabilité est associée à une pompe à efflux appartenant au système RND, Ade/IJK, naturellement active vis-à-vis d'un large spectre d'antibiotiques incluant notamment le chloramphénicol et le triméthoprime mais excluant les aminoglycosides. La présence de cette pompe explique les niveaux de CMI d'emblée élevés que l'on retrouve dans cette espèce vis-à-vis de nombreux antibiotiques. *A. baumannii* est également naturellement résistant à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprime, à l'acide pipémidique, à la norfloxacine (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et, est peu sensible à l'aztréonam [73].

1.1. Résistance acquise

L'acquisition d'une résistance résulte soit d'une mutation génétique, soit de l'acquisition d'un gène de résistance issu d'une autre cellule bactérienne par un l'un des mécanismes de transfert génétique.

1.2.1. Résistances acquises aux β -lactamines chez *A. baumannii*

1.2.1.1. La résistance acquise aux pénicillines

Les premières β -lactamase de type pénicillinase (TEM-1, TEM-2) ont été identifiées chez des souches *Acinetobacter calcoaceticus* [74,75], par la suite deux nouvelles β -lactamases de classe A d'Amber la pénicillinase CARB-5 et SCO-1 a été caractérisée chez *A. baumannii* [76]. Ces enzymes sont capables d'inactiver les amino-pénicillines.

1.2.1.2. La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération

La présence d'une séquence d'insertion IS*Abal* en amont immédiat du gène *bla_{ampC}* qui code pour la céphalosporinase naturelle (AmpC) chez *A. baumannii* conduit à une surproduction de cette dernière, en effet les valeurs de CMI des C3G et notamment de la ceftazidime vont augmenter [77,78].

Un autre mécanisme a été décrit chez *A. baumannii* il s'agit d'acquisition d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) qui confère une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes est un phénomène rare chez *Acinetobacter* (**tableau3**). Elles sont habituellement d'origine plasmidiques et sont apparues dans les années 90. L'enzyme PER-1 a été largement identifiée dans les souches isolées en Turquie. Depuis, plusieurs variants ont été caractérisés ; parmi eux, PER-7 est un variant dont l'activité hydrolytique vis-à-vis des C3G est bien supérieure. L'enzyme VEB-1 a été découverte en France au début des années 2000. Par la suite, d'autres BLSE comme TEM-92, CTXM- 2, SHV-12 et SHV-5, puis plus récemment CTX-M-15 ont été décrites [73].

1.2.1.3. Résistances acquises aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii*

L'augmentation des taux de résistance aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii* dans le monde entier est une préoccupation majeure car elle limite considérablement l'éventail des options thérapeutiques

- Mécanismes enzymatiques

La résistance enzymatique aux carbapénèmes consiste le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus fréquemment identifié chez *A.baumannii*, cette résistance peut être effectuée par plusieurs type d'enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes:

➤ Oxacillinasés à propriétés de carbapénémases (CHDLs) appartenant à la classe D d'Amber : tels que, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 ou OXA-143 (**Figure 3**) [79]. Malgré

leur faible capacité à hydrolyser les carbapénèmes, les CHDLs sont responsables de haut niveau de résistance aux carbapénèmes lorsque leur expression est associée à d'autres mécanismes non-enzymatiques [82].

Tableau III : Bêta-lactamases décrites chez *Acinetobacter baumannii* [73].

Classification d'Ambler	Type d'enzyme	Spectre d'activité	
Classe A (Serine β -lactamases)	TEM-1, 2 ; CARB-5 ; SCO-1	Penicillines + C1G	
	CTX-M-2,15 ; TEM-92 ; VEB-1 ; PEP-1 ; SHV-12	Toutes les β -lactamines sauf les céphamycines et les carbapénèmes	
	GES-11, 14	Carbapénèmes et C3G	
	KPC-2, 3, 4, 10	toutes β -lactamines	
Classe B (Métallo- β -lactamases)	IMP-1, 2, 4, 5, 6, 11 ; VIM-2,4 ; SIM-1 ; NDM	Toutes les β -lactamines sauf l'aztreonam	
Classe C (Serine β -lactamases)	AmpC+ <i>ISAbal</i>	Pas d'expression, non inductible Expression amplifiée de niveau variable R Ampicilline, C1G, C2G (bas niveau) R C3G, Piperacilline + /Ticarcilline (haut niveau)	
Classe D (Serine β -lactamases)	OXA-21	Ampicilline, Ticarcilline, piperacilline	
	Groupe I	OXA-23, 27, 49	Toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses
	Groupe II	OXA-51, 66, 69	Pas d'activité apparente (sauf si <i>ISAbal</i>)
	Groupe III	OXA-24, 25, 26, 37, 40, 72	Toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses
	Groupe IV	OXA-58	Toutes les β -lactamines carbapénèmes incluses
	OXA-143	Penicillines+ carbapénèmes	

C1G : céphalosporines de 1^{er} génération ; **C2G** : céphalosporines de 2^{ème} génération ; **C3G** : céphalosporines de 3^{ème} génération.

➤ Métallo- β -lactamases (MBLs) elles appartiennent à la classe B d'Ambler (de type IMP, VIM, SIM ou NDM) qui confèrent une résistance à toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam [79]. sont un ensemble diversifié d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'une large gamme de β -lactames, y compris les carbapénèmes (**Tableau IV**). Cette diversité est reflétée dans l'observation que ces mécanismes enzymatiques diffèrent en fonction de si une ou deux ions de zinc sont liés dans leur site actif [80,90]. De ce fait elles peuvent être inhibées *in vitro* par l'EDTA cette propriété est utilisé pour identifier leur présence.

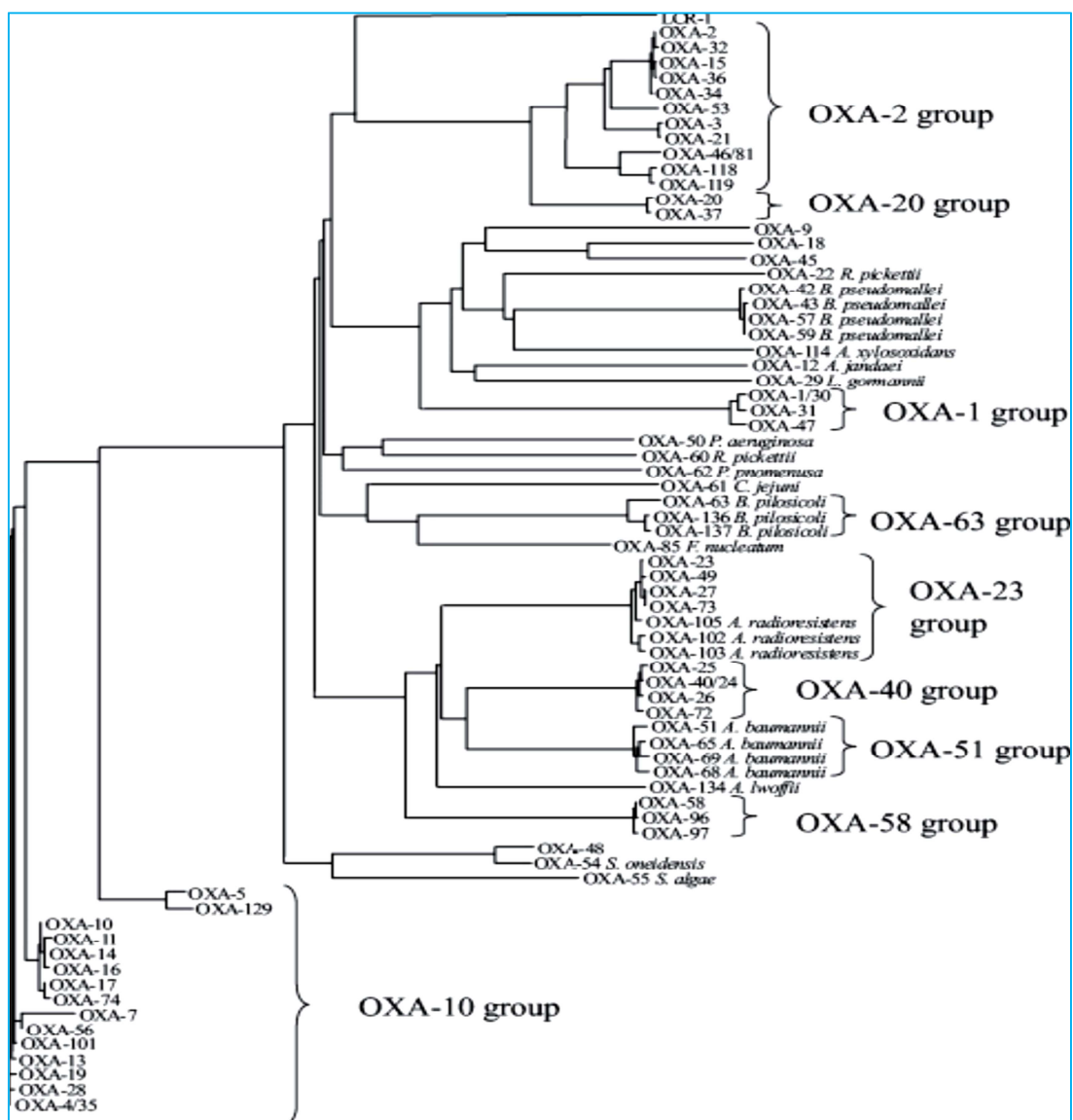


Figure 03 : Diversité de β -lactamases de classe D [82]

➤ Carbapénèmes appartenant au groupe A d'Ambler comme KPC ou certains variants de GES comme GES-14.

- Mécanismes non-enzymatique

Les mécanismes moléculaires non-enzymatiques agissent en synergie avec la β -lactamases qui a la capacité d'hydrolyser des carbapénèmes et fournir une résistance de haut niveau, mais ils ne sont pas fréquemment décrits [84]. Les mécanismes non-enzymatiques sont en général repartis en trois grands types

Tableau IV: Phénotypes de résistance d'*A. baumannii* vis-à-vis des β lactamines [73].

Antibiotiques	Phénotype 1 «Savage»	Phénotype 2 pénicilline	Phénotype 3 céphalosporin ase	Phénotype 4 2+3	Phénotype 5 carbapénèmes	Phénotype 6 BLSE
Ampicilline	S/I/R	R	R	R	R	R
Amoxicilline+Clavulanate	S/I/R	S/I/R	R	R	R	I/R
Ticarcilline	S	R	S/I	R	R	R
Ticarcilline+ Clavulanate	S	S/I/R	S/I	R	R	I/R
Pipéracilline	S	R	R	R	R	R
Pipéracilline + Tazobactam	S	S/I/R	S/I	I/R	R	I/R
Céfotaxime	S	S	R	R	R	R
Céftazidime	S	S	I/R	I/R	R	R
Céfépime	S	S	I/R	I/R	R	R
Imipénème	S	S	S	S	I/R	S
Méropénem	S	S	S	S	I/R	S
Aztréonam	S/I	S/I	R	R	I/R	R

S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant

➤ **Diminution de la perméabilité** : Des modifications de la perméabilité membranaire d'*A. baumannii* peuvent entraîner une résistance aux carbapénèmes. Ainsi, La protéine de membrane externe associée à la résistance aux carbapénèmes ou CarO est la porine la plus caractérisé chez *A. baumannii*, les analyses moléculaires des souches multirésistantes d'*A. baumannii* présentant une des CMI élevée d'imipénème (jusqu'à 16 mg / L) ont montré des modifications dans le gène *CarO* par les différents éléments d'insertion et ainsi la perte d'expression, Il a été suggéré que la protéine qui forme ces canaux pourrait permettre la capture sélective de l'ornithine et d'autres acides aminés basiques et, par homologies de structure, l'absorption de l'imipénème [86], Dans une étude protéomique, des profils protéiques de la membrane d'*A. baumannii* ATCC 19606 et un isolat clinique MDR qui était résistant à l'imipénème ont été comparés: la protéine CarO exprimé dans la souche résistante différente dans ses structures primaires et quaternaires de CarO de la souche sensible [85,87]. Il a été suggéré que ces modifications structurelles de CarO pourraient conduire à une perturbation dans la voie de diffusion des carbapénèmes ce qui confère à *A. baumannii* une résistance aux carbapénèmes [85].

➤ **Modification des PLPs** : une modification des PLPs peut être à l'origine de la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii*, Gehrleinet et al. remettent que la diminution ou l'absence de l'expression de PLP2 peut être à l'origine de la résistance à l'imipénème chez *A. baumannii* [88], cette étude a été confirmée par la suite en 2003 par Fernandez-Cuenca et al [89]

➤ **Systèmes d'efflux** : parmi les cinq super familles des systèmes d'efflux associés à la résistance aux médicaments le système RND (*Resistance-Nodulation-Division*) et le plus étudié chez *A. baumannii* dont la surexpression lui confère une résistance à une large variété d'agents antimicrobiens dont les carbapénèmes, ce système présent chez d'autres espèces du genre *Acinetobacter* [90].

1.2.2. Résistances acquises aux β -lactamines chez *Acinetobacter spp non-baumannii*

Au cours de la dernière décennie les rapports d'infections causées par des *Acinetobacter spp non- baumannii* ont augmenté considérablement, ils représentent 22% des infections causées par *Acinetobacter spp* selon une étude qui a porté sur six cent quatre-vingt isolats cliniques d'*Acinetobacter* [91], ce qui donne l'importance à l'étude de leur résistance aux antibiotiques. Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter spp* est la production de β -lactamases chromosomique ou plasmidique.

➤ **Les céphalosporinases** : des études ont rapportée la présence de plusieurs variantes de céphalosporinase chromosomique (AmpC) chez les espèces d'*Acinetobacter* et une nouvelle désignation pour cette famille de céphalosporinases a été défini (*Acinetobacter derived cephalosporinases* : ADCs), sont des β -lactamase de classe C responsable de la résistance aux pénicillines, céphalosporines et aux β -lactamines combinées aux d'inhibiteurs de β -lactamase les espèces non-*baumannii* dont l'ADC été plus fréquemment détecté sont *Acinetobacter genomicspecies 3* et *Acinetobacter genomic species 13 TU* ainsi que *Acinetobacter baylyi* (Tableau V) [92].

➤ **Les enzymes de classe A d'Ambler** : sont rarement rapportées chez *Acinetobacter* par rapport aux entérobactéries BLSE de type PER- 1 est la plus détectée parmi les serine β -lactamases de classe A chez *Acinetobacter* elles sont actives contre les pénicillines, céfotaxime, ceftazidime et l'aztréonam mais ne montre aucune activité significative contre les carbapénèmes [92,93]. D'autre β -lactamases de classe A ont été décrites à titre d'exemple KPC-10 qui a un spectre de substrat couvre même les carbapénèmes, et en 2007 une β -lactamases a spectre étroit (SCO- 1) été décrite chez *Acinetobacter spp* isolé en Argentine [92,94].

➤ **Les Métallo-β-lactamases** IMP-1, VIM-2, SIM-1 chez *Acinetobacter* genomic species 3, *Acinetobacter* genomic species 10, 13 TU et 14. IMP-4 a été identifié chez *A. johnsonii* [21].

➤ Comme chez *A. baumannii*, les **oxacillinases à activité de carbapénémase (CHDLs)** ont été rapportées. OXA-23 a été identifiée dans des souches d'*Acinetobacter* genomic species 3 et d'*A. johnsonii*. OXA-58 a ainsi été décrite chez *A. junii*, *Acinetobacter* genomic species 3, *Acinetobacter* phenon 6/ct 13TU, *Acinetobacter* genomic species 14TU et *A. radioresistens* [21].

Tableau V: Bêta-lactamases décrites chez *Acinetobacter* spp non-*baumannii* [92]

<i>Acinetobacter</i> spp.	Classification d'Ambler			
	Classe A	Classe B	Classe C	Classe D
<i>A. calcoaceticus</i>			AmpC,	OXA-24, OXA-58
<i>Acinetobacter</i> genomic species 13TU	PER-1, TEM-1	IMP-1, IMP-4, VIP-2	AmpC, SAba1-AmpC	OXA-58, ISAb3-OXA- 58, ISAb1- OXA-23
<i>Acinetobacter</i> genomic species 3	PER-1, TEM-1	IMP-1, IMP-4, VIP-2	AmpC, SAba1-AmpC	ISAb3-OXA- 58, OXA-23
<i>A. baylyi</i> ADP1			AmpC	
<i>A. junii</i>				OXA-23
<i>A. johnsonii</i>		IMP-4		ISAb1-OXA- 23
<i>A. lwoffii</i>			AmpC	OXA-134, OXA-23
<i>A. radioresistens</i>				OXA-133 et - 58 OXA-23-like
<i>A. haemolyticus</i>				OXA-23
<i>A. phenon</i> 5	PER-1, TEM-1		AmpC	OXA-23, OXA-58
<i>A. phenon</i> 6/ct 13TU	PER-1, TEM-1	IMP-8, VIM-2	AmpC	OXA-23, OXA-58
<i>Acinetobacter</i> genomic species 10		SIM-1, VIM-2 IMP1		
<i>Acinetobacter</i> genomic species 14		VIM-2		ISAb3-OXA- 58

OXA : Oxacillinase

➤ Les autres mécanismes non enzymatiques de résistance aux β -lactamines tels que la modification des PLPs, la diminution de la perméabilité et l'efflux sont aussi décrites chez les espèces non-*baumanii* [92,95].

1.2.3. La résistance aux aminosides

La cause la plus fréquente de la résistance aux aminosides chez *Acinetobacter spp* est la modification du groupe amine ou hydroxyle de l'antibiotique par des enzymes aminoglycoside modificateurs tels que aminoglycoside acetyl transferases (AACs), aminoglycoside nucleotidyltransferases (ANTs, ou AADs), et/ou aminoglycoside phosphotransferases (APHs) tous ces types d'enzyme (acétylases, adénylases et phosphotransferases) ont été décrites chez des isolats cliniques d'*Acinetobacter spp*, des études ont démontré que les gènes qui codent pour ces enzymes peuvent être portés par les plasmides, des transposons ou des intégrons, ce qui leur confère la résistance aux principales aminosides Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine, Amikacine et Isepamicine (Tableau VI) [92,95].

Tableau VI : Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez *A. baumannii* et substrats préférentiels [96].

Type d'enzyme	Nom	Substrat préférentiels
Acétylases	AAC (3)-I	Gentamicine
	AAC (3)-II	Gentamycine, Tobramycine, Neilmicine
	AAC (6')-1	Gentamycine, Tobramycine, Amikacine
	AAC (6'')-1	Gentamycine, Tobramycine, Neilmicine
Acétylases	ANT (2'')-1	Gentamycine, Tobramycine
	ANT (3'') (9)	Streptococcine, spectinomycine
Phosphorylases	AHP (3')-I	Kanamycine, Neomycine
	AHP (3')-VI	Kanamycine, Neomycine, Amikacine, Isepamicine
Méthylases	ArmA	Gentamycine, Tobramycine, Amikacine

1. La résistance aux quinolones

Les quinolones ont une bonne activité contre les *Acinetobacter spp*, mais cette bactérie a rapidement développée une résistance à ces agents chimio-thérapeutiques, Le principal mécanisme de résistance est dû à des mutations au niveau de la région QRDR (*Quinolone Resistance-Determining Region*) des gènes *gyrA* et *parC*, gènes à l'origine de l'ADN gyrase et la topoisomerase IV [96,97], ces mutation provoquent des substitutions au niveau des acides aminés GyrA et le Parc le plus souvent à Ser83 et Ser80 [98].

Un second mécanisme de résistance aux quinolones implique des mutations chromosomiques des gènes qui codent pour le système de l'efflux conduisant à l'extrusion de médicament actif, Cette pompe d'efflux a été initialement trouvée chez un isolat d'*A.baumannii* multirésistant et confère une sensibilité réduite à une large variété d'agents antimicrobiens dont la sparfloxacine, l'ofloxacine et la perfloxacine [92].

2. Support génétique de la résistance

2.1. Éléments transposables

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN qui sont capables de médier leur propre mouvement (transposition) vers de nouveaux emplacements dans le génome qu'ils habitent, Chez les bactéries, les éléments transposables peuvent en général être attribuées à l'un de deux types principaux, les séquences d'insertion (IS) et les transposons.

2.1.1. Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertions (IS) sont des éléments génétiques de petite taille (700 à 2500 pb) et mobiles de manière autonome, Ils sont composés uniquement d'un gène code pour une transposase bordé de part et d'autre d'une séquence inversée répétée (IR) [99].

A- Les séquences inversées répétées (IR)

Les IS sont délimitées de part et d'autre de deux séquences inversées répétées (IR pour *InvertedRepeat*) plus ou moins parfaites de 10 à 40 pb. Elles sont indispensables pour la transposition. Les IRs comprennent deux domaines fonctionnels. Le premier, correspondant aux 2-3 dernières paires de bases de l'IR, est impliqué dans le clivage et la réaction de transfert de brins conduisant à la transposition de l'élément, et le second est impliqué dans la fixation de la transposase (**Figure 4**). Les IRs sont reconnues par la transposase et sont associées lors des évènements de transposition [100].

B- Les transposases

La transposase est une enzyme qui a la capacité de reconnaître ces régions IR afin de mobiliser la séquence s'insertion [102], elle est composée de deux domaines

fonctionnels, le premier domaine de liaison avec l'ADN se situe dans la partie N-terminal, le domaine catalytique se situe dans la partie C-terminal [100].

C- Les séquences en répétition directe (DR)

Lors de leur insertion, de nombreuses ISs engendrent une duplication du site d'insertion de part et d'autre de leur séquence, entraînant ainsi la formation de deux petites séquences en répétition directe (DR « *Direct Repeat* ») de 2 à 15 pb situées de part et d'autre de l'IS. Cette duplication d'une séquence de l'ADN hôte est le témoin indirect d'un évènement de transposition (Figure 04) [21].

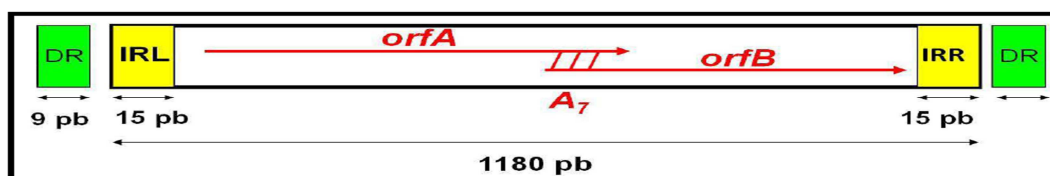


Figure 04: Exemple d'une IS, IS*Aba1* [101].

D- Rôle d'IS*Aba*

Les ISs peuvent être responsables de l'apparition des mutations d'insertion, des réarrangements génomiques, et de la propagation accrue de résistance et de virulence au sein des espèces, plusieurs ISs ont couramment et probablement été exclusivement détecté chez le genre *Acinetobacter* leur séquences sont disponibles sur le site Web est Biotoul (<http://www-is.biotoul.fr>) (Tableau VII), le rôle de IS*Aba1* dans hyper expression de gènes de résistance aux antibiotiques de *A. baumannii* tels que le gène *bla_{ampC}*, qui code pour la céphalosporinase d'origine naturelle [77], et pour le *bla_{OXA-23}*, qui code pour une oxacillinase hydrolysant les carbapénèmes [104], mais il peut agir de façon similaire avec d'autres gènes de résistance *sullI* et *bla_{OXA-58-like}*, IS*Aba1* pourrait également être responsable de la mobilité des *bla_{OXA-23}* [104].

L'IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS18, et 38 IS*Aba825* peuvent également fournir de solides promoteurs hybrides pour le *bla_{OXA-58-like}* tandis que IS*Aba4* peut également être responsable d'une augmentation de l'expression du *bla_{OXA-23}*. En outre, une perturbation du gène *adeS* médiée par IS*Aba1* régule l'expression de la pompe d'efflux AdeABC conduisant à une résistance accrue à diverses classes d'antibiotiques, d'autre part IS*Aba825* et IS*Aba125* ont été trouvés responsables de la réduction de la sensibilité aux carbapénèmes au moyen d'une inactivation par insertion du gène naturelle *Caro* codant pour un canal de la membrane externe d'*A.baumannii* [105,22].

Tableau VII: Séquences d'insertion (IS) chez *Acinetobacter spp*, origine et Numéro d'accèsion sur GenBank [22].

Noms	Famille	Numéro d'accèsion sur GenBank	Origine
IS <i>Aba1</i>	IS4	AY758396	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba2</i>	IS3	AY665723	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba3</i>	IS1	AY665723	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba4</i>	IS982	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba5</i>	IS5	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba6</i>	IS982	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba7</i>	IS5	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba8</i>	IS21	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba9</i>	IS982	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba10</i>	IS5	GQ379223	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba11</i>	IS701	CP000521	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba12</i>	IS5	-	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba13</i> (ISN1)	IS5	NC_011586	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba125</i>	IS30	AY751533	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aba825</i>	IS982	AY751532	<i>A. baumannii</i>
IS <i>Aca1</i>	IS3	AF121266	<i>A. calcoaceticus</i>
IS <i>A1008</i>	IS6	AJ251307	<i>A. calcoaceticus</i>
IS <i>Aba1236</i>	IS3	U03772	<i>A. calcoaceticus</i>
IS <i>Aha1</i>	IS5	-	<i>A. haemolyticus</i>
IS <i>Aha2</i>	IS5	-	<i>A. haemolyticus</i>
IS <i>I7</i>	IS5	U95013	<i>A. haemolyticus</i>
IS <i>Ajo1</i>	IS5	-	<i>A. johnsonii</i>
IS <i>Alw1</i>	IS5	-	<i>A. lwoffii</i>
IS <i>I006</i>	IS6	NC_004361	<i>A. junii</i>
IS <i>Acsp1</i>	Tn3	-	<i>Acinetobacter sp.</i>
IS <i>I007</i>	IS6	AJ250860	<i>Acinetobacter sp.</i> LS56-7
IS <i>I8</i>	IS30	AF043676	<i>Acinetobacter sp.</i> 13BM2716

2.1.2. Les transposons

A- Les transposons de classe I

Les transposons de classes I sont des transposons composites, encadrés par deux copies de la même IS.

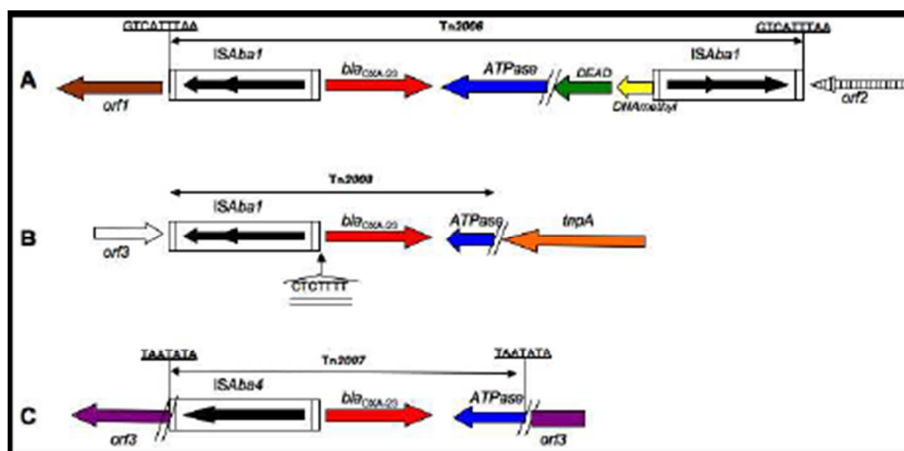


Figure 05 : Transposons associés au gène *bla_{OXA-23}* chez *A. baumannii*. (A) *Tn2006*, (B) *Tn2008*, (C) *Tn2007* [21].

Lors de la transposition d'une IS, la transposase reconnaît soit ses deux IR soit son IR gauche et l'IR droite de la deuxième copie. Cela peut générer le déplacement des deux IS. Par conséquent, il peut y avoir une mobilisation de la séquence d'ADN incluse entre les deux IS. Cette séquence peut contenir des gènes de résistance. Le gène *bla*_{OXA-23} est associé à cette structure chez *A. baumannii* (Figure 05) [21].

B- Les transposons de classe II (exemple du transposon Tn21) :

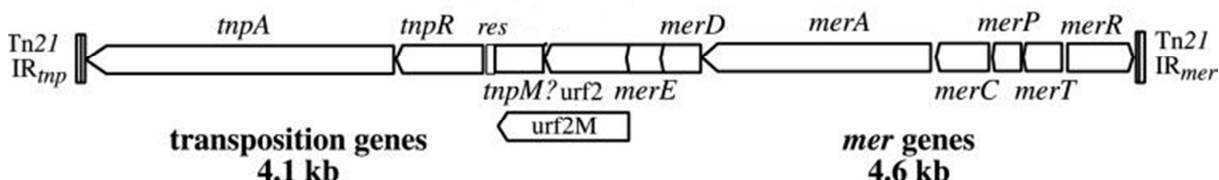


Figure 06 : Transposon *Tn21* un exemple d'un transposon de classe II [106]

Les transposons de classe II sont formés d'une transposase et d'une séquence d'ADN plus ou moins longue, situées entre deux IR. La transposase reconnaît les deux IR permettant la mobilisation. Les boîtes bleues représentent les IR gauche et droite de l'IS. Les gènes *tnpA* et *tnpR* codant pour la transposase et la résolvasse sont indiqués en rouge. Les flèches violettes représentent les gènes codant pour les protéines impliquées dans la résistance au mercure [21].

2.2. Les intégrons

Les intégrons ont eu plusieurs définitions. Actuellement celle de Hall et Collis datant de 1995 est adoptée par tous [107] : « Un intégron est une unité génétique qui inclut un site spécifique de recombinaison, capable de capturer et mobiliser des gènes contenus dans des éléments mobiles appelés gènes cassettes et un promoteur pour l'expression des gènes cassettes. Il agit comme un système naturel de clonage et comme un vecteur d'expression. » (Figure 7) [109]. Les intégrons jouent un rôle important dans la diffusion de la résistance aux agents antimicrobiens à travers la transmission horizontale [109].

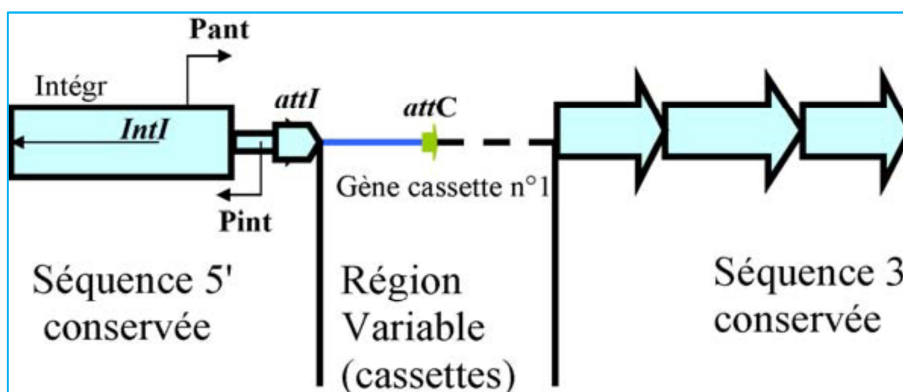


Figure 07: Représentation schématique d'un intégron [107]

Les régions de l'intégron sont délimitées par les traits noirs verticaux. Au sein de la partie 5' conservée, le grand rectangle contient le gène *intI1*, orienté selon la flèche noire et le triangle représente l'*attI*. Au niveau de la région variable un gène cassette est représenté. Le trait bleu représente le gène, codant le plus souvent une résistance aux antibiotiques et la flèche verte représente l'*attC*. La ligne pointillée représente l'emplacement d'éventuelles autres cassettes. Les flèches bleues de la séquence conservée représentent les éventuels segments de la partie 3' conservée. Pant est le promoteur d'éventuelles cassettes, Pint est le promoteur du gène *intI*

Une étude d'hybridation a indiqué que 65,6 % du total des *Acinetobacter* étudiés contiennent des intégrons, la résistance au triméthoprime (*dfrA7*) a été identifiée sur intégrons contenant de cassettes simples soutenant l'idée que la résistance à cet antibiotique est souvent associée aux intégrons, les cassettes les plus fréquemment identifiées sur les intégrons dans *A. baumannii* et autres bacilles à Gram négatif codent pour la résistance aux aminoglycosides [111].

Une enquête épidémiologique menée en chine sur 1447 isolats de bacilles à Gram négatif incluant *Acinetobacter*, a révélé la présence d'un total de 45 cassettes de gènes différents dans 845 des isolats inclus celles qui codent pour la résistance au triméthoprime (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA16*, *dfrA17* et *dfrA27*), les aminosides (*aadA*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA12*, *aadA13*, *aadA22*, *aadB*, *aac(6')-II*, *aac(6')-Iid*, *aac(6')-Ib*, *aacA4*, *aacC*, *aacC1*, *aacC4* et *ant(3'')-Ih*), les β-lactamines (*bla_{PSE-1}*, *bla_{OXA-4}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-30}*, *bla_{IMP-9}* et *bla_{IMP-25}*), chloramphenicol(*cmlA1*, *cmlA6*, *cmlA8*, *catB3* et *catB8*), quinolones (*qnrVC-like*), et la rifampicine (*arr-3*) [111].

Trois classes d'intégrons, les intégrons de classes 1, 2 et 3 regroupent la grande majorité des intégrons décrits.

A- Les intégrons de classe 1

Ce sont les intégrons les plus répandus et les plus étudiés. Leur séquence 3' conservée est constitué du gène *qaeΔ1* (qui code pour la résistance des ammoniums quaternaires), le gène *sul*(qui code la résistance pour les sulfamides) et le gène *Orfx*. Ils sont souvent associés à *Tn21*. De très nombreux intégrons de classe 1 différents ont été décrits. Ce sont en fait les intégrons de classe 1 qui sont au cœur du grave problème de santé publique actuelle que constitue la dissémination de la résistance aux antibiotiques proportion des gènes cassettes codant la résistance aux antibiotiques a été retrouvée au sein des intégrons de classe 1. La conséquence à cela, est qu'il est maintenant bien démontré

que la multirésistance aux antibiotiques est associée à la présence d'intégrons de classe 1 (Figure 08) [107].

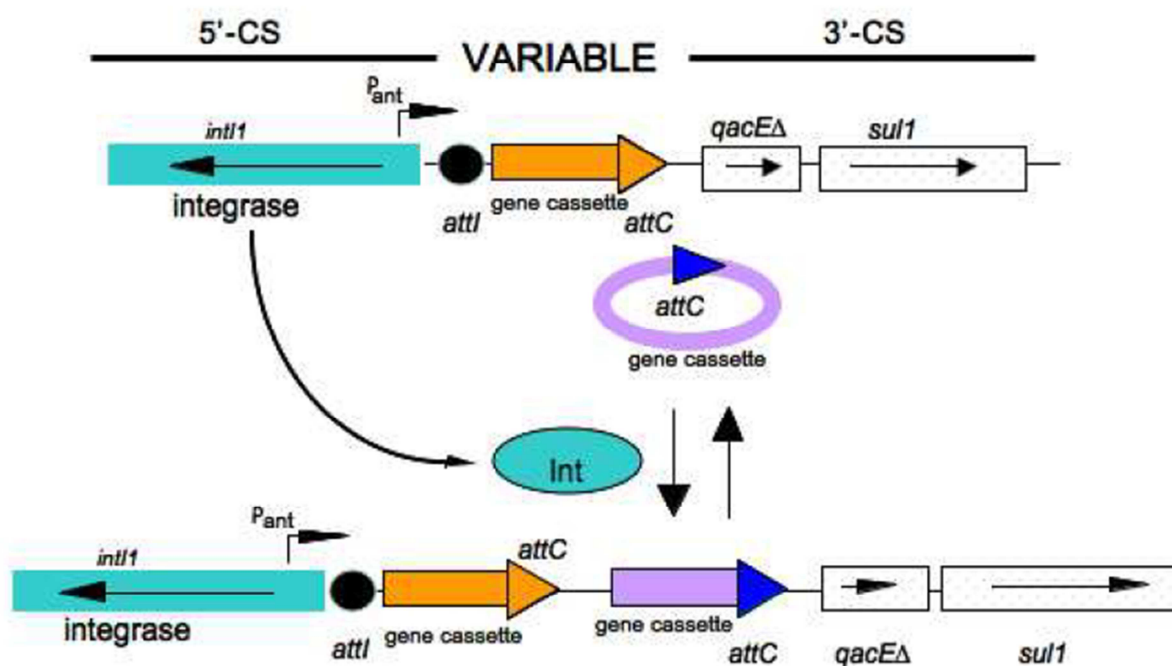


Figure 08: Structure générale d'un intégron de classe 1 et mouvement des gènes cassettes [21].

L'intégrase Int1 catalyse l'intégration et l'excision des cassettes. L'intégration des gènes cassettes se fait par recombinaison homologue entre leur site attC et le site attI. Les régions conservées 5'-CS et 3'-CS sont soulignées en noir [21].

2.3. Les plasmides

Les plasmides sont de petits fragments d'ADN double brin, circulaires et cytoplasmiques, capables de répllication autonome. Leur transmission naturelle d'une bactérie à l'autre s'effectue habituellement par conjugaison. Ils ont été découverts au Japon à la fin des années 1950 à la suite de la constatation de l'existence simultanée dans les selles de malades, de souches d'*Escherichia coli* et de *Shigella dysenteriae* co-résistantes à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et aux sulfamides. Ces souches ne pouvaient être des mutants car la probabilité de co-sélectionner des quadruples mutants est de l'ordre de 10^{-24} alors que la population d'entérobactéries n'excède pas 10^8 dans le tube digestif de l'homme. La présence d'un nouvel élément génétique appelé *Resistance Transfer Factor*, puis « plasmide » a permis d'expliquer l'apparition de ces souches. Les plasmides ont donc été associés à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dès leur découverte [111].



Chapitre III

1. Biofilms

Les biofilms ont une grande importance pour la santé publique, car la formation de biofilm diminue considérablement la sensibilité aux agents antimicrobiens. Cette sensibilité peut être intrinsèque (comme un résultat naturel du développement de biofilm) ou acquise (en raison du transfert d'éléments extra-chromosomiques à des organismes sensibles dans le biofilm) [117].

2. Définition

Un biofilm est un assemblage de cellules microbiennes formant une communauté microbienne adhérant à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères extracellulaires [112], La formation de biofilms est un processus de fixation irréversible des micro-organismes sur une surface donnée [113].

Les surfaces pouvant servir de support peuvent être de différentes natures : roches, canalisations plastiques ou métalliques, muqueuses de l'organisme (cas de *Acinetobacter* dans les alvéoles pulmonaires de patients atteints de la mucoviscidose [114]). Les biofilms se forment ainsi à l'interface surface/liquide, mais peuvent également être observés à l'interface air/liquide. Les flocs ou agrégats sont également considérés comme des biofilms [115]. La matrice extracellulaire est constituée d'exopolymères bactériens, de matière organique et non organique, ainsi que de macromolécules du milieu environnant [116].

3. Etapes de formation de biofilm

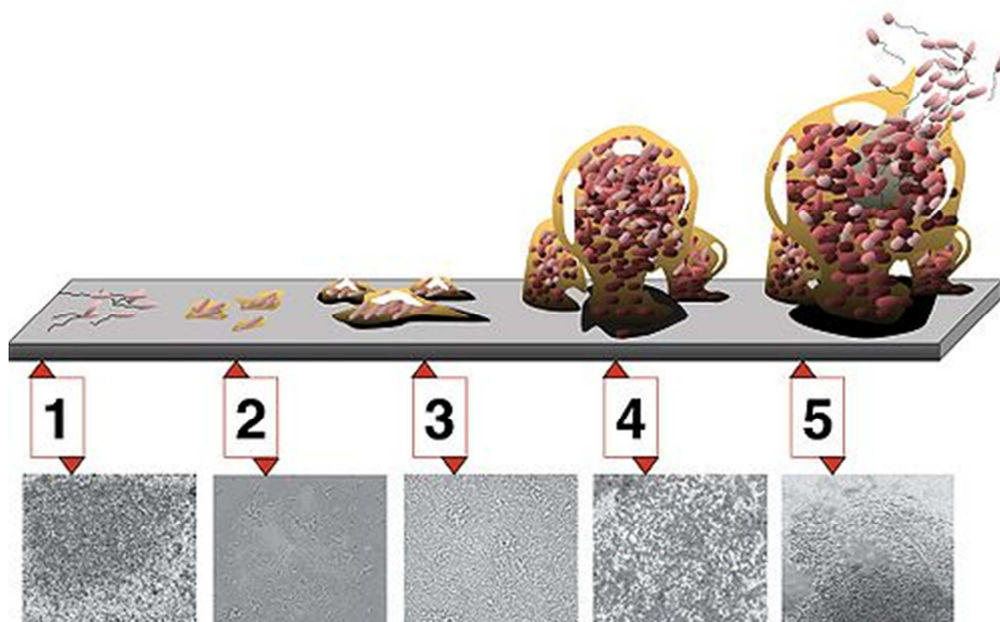


Figure 09 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm et visualisation par microscopie à transmission : 1 adhésion réversible, 2 adhésion irréversible/formation de micro-colonies, 3 et 4 maturation, 5 détachement [123].

3.1. Film primaire ou film conditionnant

Un phénomène important pour l'étape d'adhésion des bactéries est le conditionnement des surfaces ou le film conditionnant [118]. (En effet l'immersion d'un support vierge de toute contamination dans un liquide est immédiatement suivie par une adsorption de sels, de protéines, de glycoprotéines,). Cette adsorption peut être en partie conditionnée par les propriétés physico-chimiques de la surface et des molécules. La formation rapide d'un film entraîne une modification des propriétés de surface, et éventuellement une modification de l'affinité des bactéries pour cette surface (**figure 09**) [116].

3.2. Transfert des bactéries vers le support

Les bactéries peuvent entrer en contact avec le support grâce à différents moyens : diffusion passive résultant des mouvements Browniens, transport passif via le fluide circulant, ou mouvements actifs grâce à des structures telles que les flagelles [116].

➤ Le transport par diffusion met en jeu les mouvements browniens qui permettent à la bactérie d'atteindre une surface en conditions statiques « au hasard ». Ces mouvements sont négligeables par rapport aux autres types de transfert excepté à proximité d'un support où ils prédominent [116].

➤ Le transport par convection, plus rapide, est en relation avec le flux dynamique de la solution aqueuse (agitation du milieu et forces d'écoulement) [116].

➤ Enfin le rôle de la mobilité spécifique de la bactérie lors de cette étape de transfert doit être envisagé. Théoriquement, les bactéries possédant des flagelles et pili vont pouvoir se déplacer et se rapprocher plus facilement des surfaces, notamment par chimiotactisme. Cette capacité à orienter son déplacement ne peut intervenir pour de longues distances mais peut être mise à profit sur de courtes distances, notamment à proximité d'une surface, lorsqu'il existe un gradient de concentration des nutriments [116,119].

Ceci a été démontré pour des bactéries flagellées telles qu'*Altermona ssp.* *Alcaligene ssp.*, ou *Vibrio alginolyticus*, avec une augmentation du taux d'adhésion corrélée à la vitesse de déplacement des bactéries [119]. Cependant, ce concept n'est pas généralisable et lors de la même étude, la souche de *P.aeruginosa* testée ne montrait pas de variation de taux d'adhésion en fonction de la vitesse de déplacement. Dans ce cas, la faible affinité de *P. aeruginosa* pour une surface en verre était prédominante par rapport au facteur mobilité (**figure 09**).

Un phénomène important pour l'étape d'adhésion des bactéries est le conditionnement des surfaces. En effet l'immersion d'un support vierge de toute contamination dans un liquide est immédiatement suivie par une adsorption de sels, de protéines, de glycoprotéines, Cette adsorption peut être en partie conditionnée par les propriétés physico-chimiques de la surface

et des molécules. La formation rapide d'un film contenant des matières organiques entraîne une modification des propriétés de surface, et éventuellement une modification de l'affinité des bactéries pour cette surface. Ces dépôts organiques ou non organiques n'étant pas répartis de manière homogène sur la surface immergée, la colonisation bactérienne sera plus ou moins influencée. La résultante des différentes forces décrite est un rapprochement plus ou moins aléatoire de la bactérie de la surface [116].

3.3. L'adhésion initiale

Acinetobacter est capable d'adhérer à plusieurs types de surface biotique ou abiotique [32.120]

A- Adhésion initiale réversible

Les premières étapes de l'interaction des cellules avec la surface constituent l'adhésion réversible. Une simple agitation du milieu ou une variation de sa composition ou une modification de la température peut éloigner la bactérie du support. Cette étape est très rapide et n'impose pas que la particule soit « vivante ». Ainsi, tout matériau en contact avec un fluide véhiculant des bactéries inactivées les verra quand même se déposer à sa surface. L'adhésion initiale est la résultante de différents types de forces opérant entre la surface inerte et la surface de la bactérie elle-même: **(i)** les forces d'attraction de Van derWaals, **(ii)** les forces électrostatiques (souvent répulsives car la plupart des bactéries et des surfaces inertes sont chargées négativement), **(iii)** les interactions hydrophobes pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion, **(iv)** les interactions stériques toujours répulsives. La faible énergie de ces liaisons explique la notion de « réversibilité » par simples mouvements Browniens des bactéries [116,121].

B- Adhésion initiale irréversible

Le rapprochement de la bactérie du support va entériner d'autres types d'interactions conduisant à une adhésion irréversible de la bactérie [121].

L'adhésion irréversible des bactéries implique le fait que les organismes immobilisés soient vivants (ce qui n'était pas une condition clé dans l'étape réversible), capables de reconnaître leur position proche d'une surface, d'exprimer un certain nombre de gènes et de synthétiser en particulier une grande quantité d'exopolymères organiques impliqués dans l'ancrage irréversible des bactéries à leur support [116,121,122].

Cette étape est dépendante du temps et nécessite que les microorganismes soient capables d'exprimer un certain nombre de gènes conduisant à l'acquisition de nouvelles structures adhésives. Ces éléments sont également importants dans la mise en place des interactions entre bactéries et dans la structuration du biofilm. Les gènes impliqués dans la

synthèse de ces structures ont été caractérisés chez de nombreuses espèces bactériennes incluant des bactéries à Gram positif: *Staphylococcus epidermidis*, des bacilles à Gram négatif: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter* et des mycobactéries [116].

3.4. Colonisation de la surface

L'adhésion irréversible va conduire à la présence de cellules isolées, voire d'agrégats, à la surface du matériau ou de la muqueuse. L'étape de colonisation consiste en une accumulation plus ou moins intense et rapide par division cellulaire des bactéries adhérentes, mais aussi par recrutement continu de bactéries planctoniques. La colonisation peut être divisée en 5 phases, caractéristiques d'une croissance de biomasse [116,121].

- Phase de latence qui inclut la phase d'adhésion initiale avec adaptation des cellules bactériennes à leurs nouvelles conditions de vie,
- Phase d'accélération caractérisée par une forte augmentation de la biomasse fixée et par une consommation élevée des nutriments (azote et oses) en liaison avec les réponses adaptatives,
- Phase d'accumulation linéaire qui correspond aux vitesses et taux maximaux de production de biomasse, de protéines et de polysaccharides au sein de la structure,
- Phase de ralentissement conditionnée par la nature et la disponibilité en substrats au sein de la phase liquide, mais également au sein de la structure, par la surface disponible l'hydrodynamique du système,
- Enfin, la phase de stabilisation apparente caractérisée par un équilibre dynamique entre la perte de biomasse (mortalité bactérienne et détachement) et la persistance d'une multiplication bactérienne (étape de la maturation de biofilm).

Ce processus correspond donc à une occupation progressive de la surface disponible (colonisation horizontale) et à un développement en épaisseur, conduisant à la formation typique de micro-colonies [116].

La quantité d'EPS produite ainsi que la nature et les propriétés de ces EPS varient en fonction des conditions environnementales: quantités de nutriments, présence de biocides, hydrodynamique [125,126], Allison et al ont conclu que le détachement de biofilm coïncide avec la réduction de la quantité d'EPS [126].

3.5. La maturation

La maturation se traduit généralement par une architecture complexe, la formation des canaux, des pores permettant une circulation des nutriments, enzymes et déchets [123], et implique aussi le développement de grappes de cellules [129].

Le biofilm va donc acquérir une structure tridimensionnelle caractéristique et très bien décrite dans le cas de *P. aeruginosa*. Les unités de base ont été décrites comme des structures en forme de « champignons », au sein desquels les bactéries ne représentent que 10 à 15% associées à 75% à 90% de matrice extracellulaire [123,127], au cours de ce stade du développement le biofilm atteint son épaisseur maximale [128].

3.6. Dispersion du biofilm

La dernière étape dans le développement d'un biofilm est le stade de dispersion. Au cours de cette étape, les bactéries au sein des groupes de cellules peuvent être observées se détacher et migrer activement à l'écart des parties intérieures de grappes de cellules laissant derrière elles une structures qui apparaissent en forme de coquille, avec un centre creux, sans doute, ce processus de dispersion permet aux cellules de se baigner de nouveau dans le milieu pour obtenir un meilleur accès aux éléments nutritifs tout en permettant en même temps un meilleur accès aux nutriments pour les cellules qui restent attacher [128].

4. Quorum sensing et biofilm

Il s'agit du système LuxI/luxR médié par des acyl-homosérines lactones (AHLs) (figure 10) produites par une synthèse et reconnues par un régulateur à faible densité cellulaire, la synthèse est également faiblement exprimée. Les AHLs vont s'accumuler dans le milieu extra-cellulaire au cours de la croissance et lorsque leur concentration atteint un seuil, vont interagir avec leur récepteur spécifique. La formation du complexe récepteur/AHL entraîne la modulation de l'expression des gènes cibles dont le gène de la synthèse, d'où le nom d'auto-inducteurs donné aux AHLs. Cette boucle d'auto-induction conduit à l'activation du système chez les bactéries voisines, expliquant la notion de réponse coordonnée de l'ensemble de la population [132].

Quorum sensing (QS) dans *A. baumannii* semble avoir un rôle régulateur dans la formation de biofilm [130]. La survie et la croissance dans l'environnement exigent des attributs tels que la résistance à la dessiccation et aux antibiotiques, la polyvalence dans les exigences de croissance, la capacité de formation de biofilm éventuellement, l'activité QS [131].

Le QS a été montré un régulateur d'une grande variété de mécanismes de virulence chez de nombreux organismes à Gram négatif dont *Acinetobacter*, la présence de QS chez *Acinetobacter* a été déduite à partir de la détection d'un gène qu'est impliqué dans la production d'auto-inducteur qui peut commander les différents processus métaboliques, la production de facteurs de virulence, y compris la formation de biofilm [132]. Le réseau du QS chez *Acinetobacter* est médié par des molécules de signalisation AHLs [132,133], Jusqu'à

cinq molécules différentes de signal de QS sont plus détectables (produite en abondance) au cours de la phase stationnaire, ont été identifiés en *Acinetobacter*, ce qui indique qu'il peut s'agir d'un mécanisme central de l'auto-induction de multiples facteurs de virulence dont la formation de biofilm [132].

Les acylhomosérine lactones (AHL) sont une classe importante de molécules auto-inductrices utilisé par les bactéries à Gram négatif dont *Acinetobacter* pour la communication intra espèce et qui sont les mieux caractérisées jusqu'à ce jour, les AHLs du système de signalisation QS semblent contrôler diverses fonctions physiologiques telles que la résistance aux antibiotiques, la formation de biofilms et la conjugaison plasmide Ti [132].

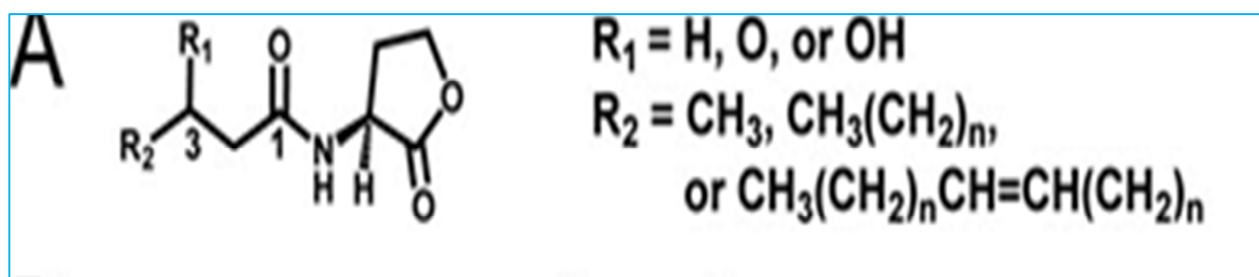


Figure 10: Schéma de la structure générale des AHL: (A) Structure de AHLs, les AHLs varient par substitution à la position C3 (R1) et la longueur et la chaîne non-saturée d'acyle (R2). HSL se réfère à D/L-homosérine lactone ; AHL se réfère à N-acyl-D/L-homoserine lactone, avec n'importe quelle longueur de chaîne d'acyle ou le ou le degré de substitution [134].

Les AHLs sont composés d'anneaux de HSL transportant des chaînes acyles en C4 à C18 en longueur. Ces chaînes latérales abritent modification occasionnelle notamment à la position C3 ou des doubles liaisons sont insaturées [132]

5. Biofilm et résistance

La capacité d'*Acinetobacter* d'adhérer et former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques peut expliquer son succès dans le milieu hospitalier. Les biofilms pourraient contribuer à la persistance dans l'environnement menant à la colonisation et l'infection de l'hôte par *Acinetobacter*. Les mécanismes par lesquels les biofilms contribuent à une sensibilité réduite restent encore peu clairs, mais un certain nombre d'explications différentes ont été proposées. Les biofilms sont intrinsèquement résistants aux agents antimicrobiens, les raisons étant l'échec de la pénétration d'un agent tout profondément pour atteindre les cellules de biofilm ou le ralentissement de croissance cellulaire due au ralentissement du métabolisme, Pour les désinfectants chimiques tels que le chlore, l'iode, le peroxydés et des antibiotiques très chargés comme les glycopeptides, le glucocalyx affecte considérablement la capacité de l'agent antimicrobien d'atteindre les cellules qui sont profondément installées dans le biofilm,

d'autre part, pour les agents non chargés, tels que les β -lactames, une telle limitation de la réaction diffusion a peu de chances de se produire, le glycocalyx peut cependant contribuer à une sensibilité réduite aux β -lactamines si l'antibiotique est susceptible d'être inactivé par la β -lactamase et si l'enzyme est retenue à l'intérieur de biofilm au cours de sa croissance, dans de tels cas, l'enzyme est concentrée à l'intérieur de la matrice de polymère extracellulaire et hydrolyse le médicament est effectuée lors de sa pénétration, la résistance aux β -lactamines à dans le biofilm est plus susceptible d'être en fonction d'un taux de croissance réduit l'intérieur des cavités profondes de biofilm qui provoque l'expression des protéines de liaison aux pénicillines différentes de celles normalement visées par ces antibiotiques. Le ralentissement de croissance affecte également l'action bactéricide des β -lactames car l'inhibition de la transpeptidase, qui induit des lésions cellulaires, est directement liée au taux de croissance [132]. Une enquête a révélé que le transfert de gènes dans les biofilms se produit beaucoup plus fréquemment ainsi le transfert horizontal de gènes à l'intérieur d'une matrice du biofilm offre un grand avantage en termes de fréquence et stabilité [135].

Annexe 1 : Identification d'*Acinetobacter* par la galerie classique

Elle est composée de cinq milieux

Le milieu TSI (Tri sugar iron) : Ce milieu permet la lecture de cinq caractères : La fermentation du glucose, lactose et saccharose, la production d'hydrogène sulfuré et la production de gaz.

Le milieu mannitol-mobilité : il permet de lire : L'utilisation du mannitol et la mobilité du germe.

Le milieu citrate de Simmons : il permet de lire l'utilisation de citrate par le germe

Test "ONPG" : il permet de lire la possession d'une β -galactosidase

Le milieu urée-indole : il permet de lire : La possession d'une uréase, tryptophane désaminase en présence de chlorure ferrique et un tryptophanase (production d'indole).

Les tests d'oxydase et de catalase sont systématiquement effectués sur des colonies isolées.



Figure : Illustration de l'identification du genre *Acinetobacter* par galerie classique

La figure 15 représente une galerie classique après incubation d'*Acinetobacter*, elle est composée de cinq milieux, les résultats sont les suivants :

TSI (Tri sugar iron): La fermentation du (glucose, saccharose et lactose) est négative, production de H₂S et de gaz négative.

Mannitol-mobilité: La fermentation du mannitol est négative.

Citrate de Simmons: l'utilisation du citrate est positive.

Test "ONPG": absence de β -galactosidase.

Urée-indole absence de (uréase, tryptophanase (après l'ajout de kovacs) et tryptophanase désaminase).

Annexe 2 : L'antibiogramme

1- Principe

La technique consiste à déposer à la surface de la gélose préalablement ensemencée à l'écouvillon avec une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland, des disques imprégnés des différents antibiotiques ; Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition dont le diamètre est mesuré afin de déterminer la sensibilité de la souche à l'antibiotique en question.

Les antibiotiques en disques sont : Ticarcilline (TC), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PRL), Pipéracilline + tazobactam (TZP), cefépime (FEP), Imipénème (IMP), Ceftazidime (CAZ), Azteonam (ATM), Tobramycine (TBM), Amikacine (AK), Gentamicine (GN), Kanamycine (K), (SXT), Ciprofloxacine (CIP), Fosfomycine (FOS), Colistine (CT).

2- 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.

3- Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié (Mac Conkey, Hektoen, BCP...) on racle 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 est mesurée à l'aide d'un densitomètre et elle doit être équivalente à 0,5

4- Ensemencement :

- On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- On l'essor en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélose, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- L'opération est répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° a chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Pour finir l'ensemencement on passe l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- il faut recharger l'écouvillon pour ensemencer la 2^{ème} boîte

5- Le choix des antibiotiques

- Les antibiotiques testés sont choisies selon les recommandations de CLSI, la disposition des disques d'antibiotiques testés pour *Acinetobacter* est montrée dans la figure

Les antibiotiques en disques sont : Ticarcilline (TC), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PRL), Pipéracilline + tazobactam (TZP), cefépime (FEP), Imipénème (IMP), Ceftazidime (CAZ), Azteonam (ATM), Tobramycine (TBM), Amikacine (AK), Gentamicine (GN), Kanamycine (K), (SXT), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CT). Colistine (CT). **application des disques d'antibiotiques :**

- on applique 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.
- Les disques sont appliqués à l'aide distributeur ou une pince bactériologiques stériles
- Il est conseillé de ne pas déplacer les disques après l'application.

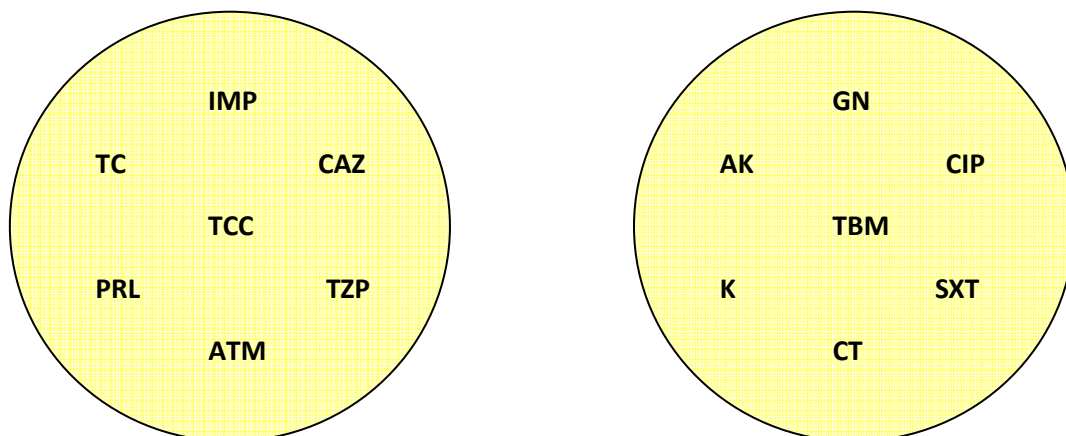


Fig : Disposition des disques d'antibiotiques utilisés pour le test de sensibilité d'*Acinetobacter* spp.

6- lecture

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C en atmosphère aérobie, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse, et par comparaison des résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture établit par le CLSI (Annexe), on peut définir si la souche est sensible (S), résistante (R), ou intermédiaire (I)

Annexe 3 : Recherche de métallo- β -lactamase (M β L) :

a. Test de Hodge modifié

La version modifiée du test de Hodge, test phénotypique initialement mis au point pour permettre la détection de pénicillinases, est largement utilisée pour la détection des carbapénémases. Ce test consiste à ensemencer en culture conflente (à l'aide d'un écouvillon) une dilution au 1/10^{ème} d'une suspension de Densité Optique (DO) = 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur une gélose Muller Hinton. Ensuite, un disque d'imipénème est déposé au centre de la boîte la souche testée et deux autres souches témoins positif (carbapénémase +) et négatif (carbapénémase -) sont ensemencées de manière radiale à partir du disque jusqu'au bord de la boîte de Pétri. La présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif après incubation pendant 18 h à 37°C.



Fig : Test de Hodge modifié : st souche teste ; t- témoin- ; t+ témoin +

b. Le test d'EDTA

Basé sur l'inhibition de l'activité des différentes carbapénémases par l'EDTA, en effet Les métallo- β -lactamases comportent au niveau de leur site actif un ion zinc essentiel à leur activité, d'où l'effet inhibiteur d'agents chélateurs de cations divalents comme l'EDTA

Trois disques (IMP, IMP+ 4 μ L EDTA, 4 μ L EDTA) sont déposés sur une gélose Muller Hinton a préalablement été ensemencée par écouvillonnage d'une suspension de DO = 0.5 Mc Farland de la souche a testé

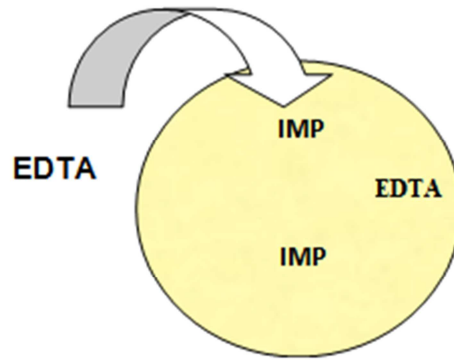


Figure : disposition des disques d'antibiotiques utilisés pour le test d'EDTA

Après 18 heures d'incubation, les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA était supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul sont considérées comme souches productrices de métallob-lactamase

Annexe 4 : Evaluation de la formation du biofilm

La méthode tube (TM) :

A partir d'une boîte de culture de 24h, ensemencer une colonie dans 10 ml de bouillon BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incubé a 37°C pendant 24h.

Après incubation on les rince avec le tampon phosphate salin PBS (pH 7,3) et on les sèche. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet (0,1%) pendant 5 minutes. L'excès de colorant a été supprimé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée

La formation du Biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La Formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation de biofilms est notée comme de 0 pour absent, + pour faible, ++ pour modéré et +++ pour fort.

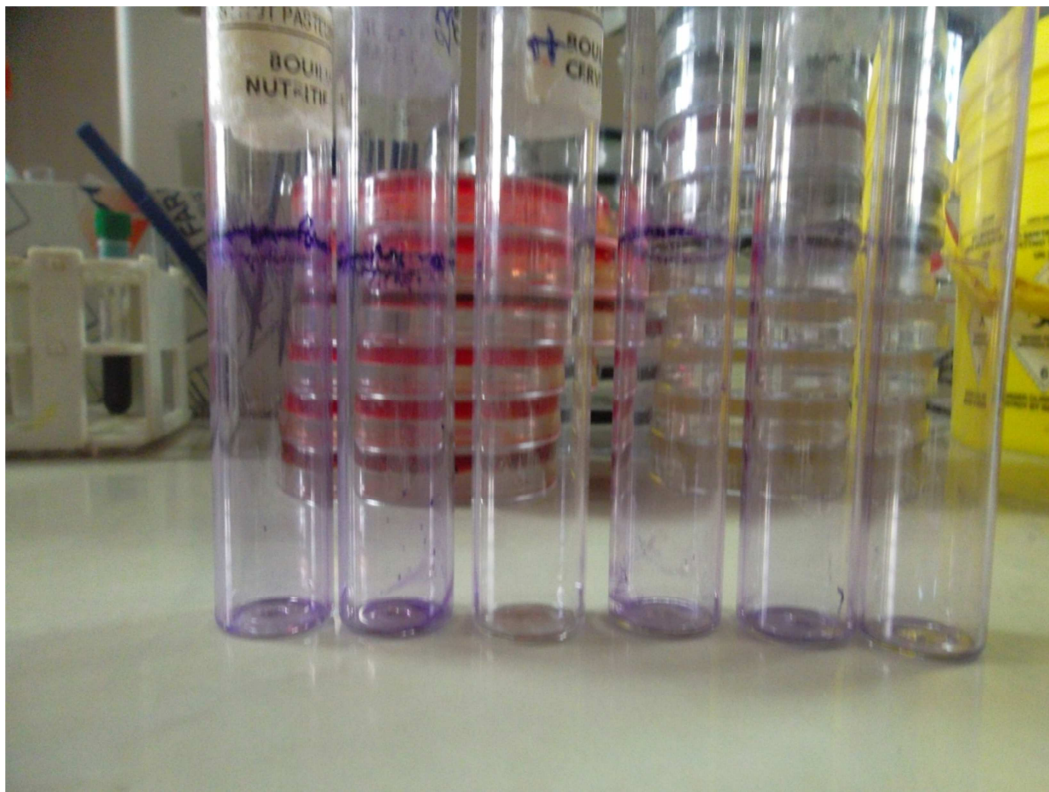


Figure : Sélection des souches d'Acinetobacter adhérentes et non adhérentes

La méthode de Plaque de culture de tissus (TCP)

A partir d'une boîte de culture de 24h, inoculer une colonie dans 10ml de bouillon BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 18h.

On effectue une dilution au 1/100 avec du milieu frais (BHIB). Les 96 puits des microplaques ont été remplis avec 0,2 ml de la dilution ainsi que de 0.2 ml de bouillon de culture (BHIB) qui servira de témoin stérile.

Après 18 heures d'incubation à 37°C le contenu de chaque puits a été retiré en tapant doucement sur les microplaques, les puits ont été lavés quatre fois avec 0,2 ml de tampon phosphate salin (PBS pH 7,2) pour éliminer les formes bactériennes planctoniques. Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles dans la plaque ont été fixés avec de l'acétate de sodium (2%) pendant 15 min et colorés avec du cristal violet 0.1 % pendant 5 minutes. L'excès de colorant a été ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques ont été séchées

Les DO des biofilms bactériens colorés ont été lus avec un lecteur microplaque standard (BioteK Instruments® ELX 800) à une longueur d'onde de 450 nm. Les isolats ont été classés en trois catégories : non adhérents, densité optique égale ou inférieure à 0.111 ; faiblement adhérents, la densité optique de 0.111 à 0.222 ; fortement adhérents, la densité optique est supérieure à 0.222

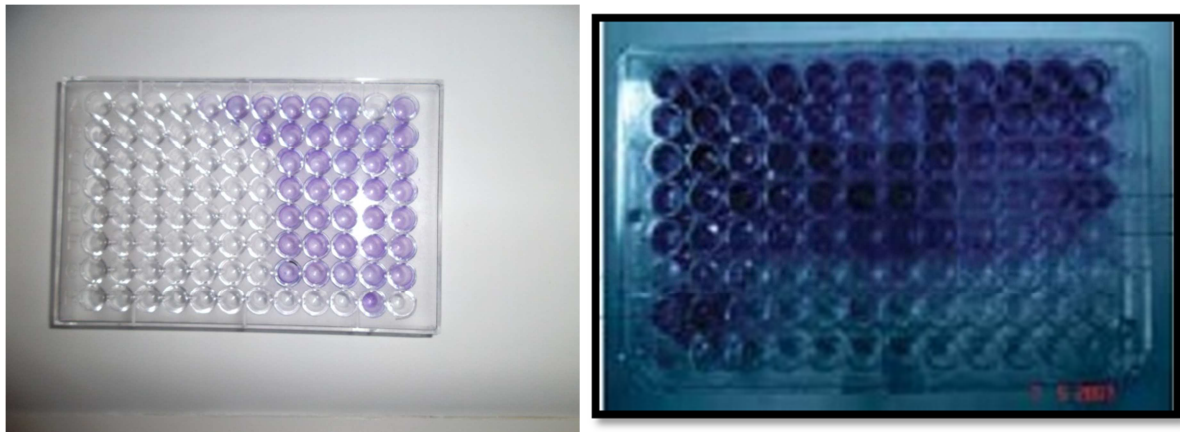


Fig : Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP des souches d'*Acinetobacter*

Annexe 05 : EDTA

L'EDTA, ou acide éthylène diamine tétraacétique, est un acide diaminotétracarboxylique de formule $C_{10}H_{16}N_2O_8$.

L'EDTA comporte six sites basiques, quatre correspondant aux bases conjuguées (carboxylates) des fonctions carboxyliques et deux correspondant aux fonctions amines. Ces sites basiques sont également des centres ligands, faisant de l'EDTA un ligand hexadentate (ou parfois tétradentate, lorsque seuls les sites carboxyliques sont utilisés). C'est d'ailleurs sa principale caractéristique, son fort pouvoir chélatant (ou complexant) par lequel il forme des complexes métalliques très stables, ce qui en fait un poison. Dans les complexes, l'EDTA est lié aux cations métalliques sous la forme d'une de ses bases conjuguées.

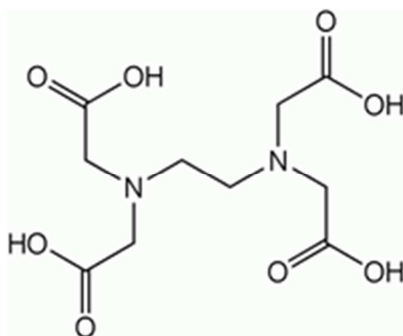


Figure : structure chimique de l'EDTA

Applications :

Il est susceptible d'être utilisé dans de nombreuses applications, par exemple dans l'industrie du papier, la photographie ou les industries de l'hygiène et l'alimentaire (antioxygène, agent de conservation et séquestrant E385). En raison de sa toxicité, la concentration est évidemment adaptée à l'usage. L'EDTA est utilisé pour traiter des eaux (par exemple dans les lessives), pour éviter les précipitations (entartrage).

- En biochimie, l'EDTA est utilisé comme inhibiteur des métallo-enzymes. Son utilisation est très fréquente dans la purification des acides nucléiques (ADN ou ARN) et des protéines (voir tampon TAE et tampon TBE). En séquestrant en particulier les ions magnésium Mg^{2+} , il bloque l'activité de nombreuses nucléases qui sont

Annexe 05 : EDTA

dépendantes de cet ion. L'EDTA est également un inhibiteur des métalloprotéases à zinc et limite ainsi l'hydrolyse des protéines dans les extraits cellulaires. En génie biologique, l'EDTA est utilisé en routine pour stopper l'activité de polymérase, la chélation des ions calcium modifiant la conformation des enzymes.

- En médecine, l'EDTA, en formant des chélates ferriques (du fer(III)), permet de lutter contre les surcharges tissulaires en fer (hypersidéroses). L'EDTA est utilisé aussi dans les intoxications par métaux lourds. Il est également utilisé comme conservateur dans les collyres, en conjonction avec d'autres conservateurs tels que le thiomersal ou le chlorure de benzalkonium. L'EDTA est aussi utilisé comme *anticoagulant*, notamment dans les tubes de sang, puisqu'il capte les ions Ca^{2+} qui sont un facteur important de la coagulation.

Annexe 06 : WHONET 5.6

Introduction :

Le logiciel WHONET est une série de programmes informatiques qui facilite la gestion des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de germes bactériens.

Ce dernier utilisant ces données aide à la meilleure compréhension de l'épidémiologie des résistances aux antibiotiques et le développement de pratiques de prescription rationnelles et de procédures de contrôle des infections. Ces données pourront être employées à un niveau local et pourront aider les laboratoires dans la sélection des antibiotiques en reconnaissant et en soulevant des problèmes de résistance au plan local et en identifiant des problèmes de contrôle de qualité.

Le but de WHONET est l'établissement de réseaux nationaux et internationaux de surveillance permanente de la résistance sur une grande échelle.

Développé par John Stelling pour l'OMS en 1989 a été choisi pour créer, gérer et exploiter une base de données bactériologiques à partir de fichiers issus de diverses sources et de formats différents. Il permet notamment d'interpréter les données de sensibilité aux antibiotiques à partir de données brutes quantitatives en sélectionnant des valeurs critiques de référence dans le pays. Il est possible de faire une analyse croisée des antibiotiques et des bactéries, d'intégrer quelques données individuelles sur le patient (sexe, date de naissance, médecin prescripteur ou service) et d'analyser les profils de résistance aux antibiotiques.

Plusieurs pays l'utilisent (voir figure ci-dessous). Une mise à jour régulière est faite pour ce programme, tenant compte des nouvelles recommandations des différents comités d'antibiogramme.

En Algérie, ce logiciel est utilisé depuis 1999 par l'ensemble des membres du réseau de bactériologie (A.A.R.N.). Grâce à cet outil, les résultats d'antibiogrammes sont saisis puis analysés par les microbiologistes. Ceci permet l'édition d'un rapport annuel d'évaluation sur les données de résistance bactérienne aux antibiotiques au niveau national.

Annexe 06 : WHONET 5.6

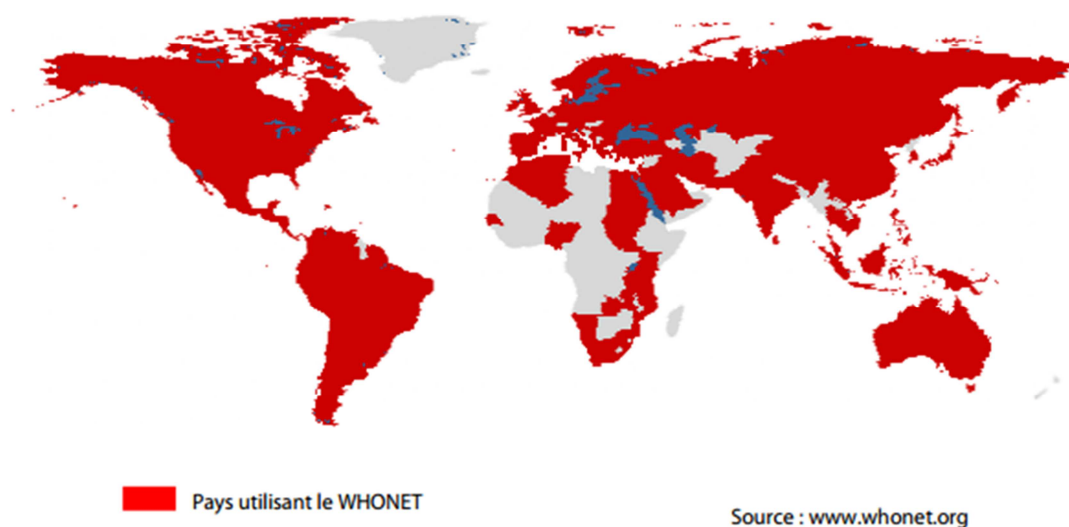


Figure : Utilisation du logiciel WHONET dans le monde en mai 2011

Caractéristiques du logiciel :

- La saisie des données clinique et microbiologique de dépistage systématique ou d'études de recherche ;
- Configuration modulaire permettant la personnalisation du logiciel pour des cliniques locales, des recherches et des besoins épidémiologiques ;
- Analyse des résultats de laboratoire, y compris les annonces en ligne isolés, les statistiques des tests de sensibilité aux antimicrobiens, des études de profils de résistance à plusieurs médicaments, et la détection de l'hôpital et foyer de la communauté ;
- Lignes directrices d'interprétation de test de sensibilité pour la plupart des méthodes d'essai normalisées ;
- Formats de structure de fichier de données simples et de sortie compatibles avec une grande base de données, tableaux, logiciels statistiques et de traitement de texte.

Annexe 7 : Préparation du BHIB additionné de 2% de saccharose

Domaine d'utilisation

Le bouillon coeur-cerveille, milieu nutritif tamponné, est utilisé pour la culture d'une très grande variété de microorganismes aérobies ou anaérobies, incluant levures et moisissures. Il convient aussi pour la mise en évidence de la staphylocoagulase

Historique

En 1919, Rosenow a formulé un excellent milieu pour la culture des streptocoques en ajoutant des fragments de tissu cérébral à du bouillon glucosé. Le bouillon coeur-cerveille en est dérivé.

Principes

- Le bouillon coeur-cerveille reprend la formule originale de Rosenow dans son principe.
- Sa richesse en éléments nutritifs permet aux bactéries exigeantes d'atteindre rapidement la phase stationnaire de croissance

Formule - type

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait coeur-cerveille17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique2,5 g
- Glucose.....2,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

Préparation du BHIB additionné de 2% de saccharose

- Mettre en solution 37,0 g de milieu déshydraté plus **20 g de saccharose** dans 1 litre d'eau distillée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 8 : Tampon phosphate salin

Le tampon phosphate salin (souvent abrégé **PBS**, de l'anglais *phosphate buffered saline*) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. En général, la concentration de ces sels est celle du corps humain (isotonicité). Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter. Il est prévu pour un usage sur les cellules maintenues hors de l'incubateur à CO₂ et n'est pas conçu pour des incubations à long terme. Son pouvoir tampon repose sur le couple dihydrogénophosphate / hydrogénophosphate (pK_A= 7,2), qui est par ailleurs un des trois grands mécanismes permettant le maintien du pH sanguin (HPO₄²⁻ + H⁺ = H₂PO₄⁻).

Préparation :

Pour préparer 1000 mL de PBS 1x :

Concentration et réactifs	Quantité
137 mM NaCl	8,0 g/L
2,7 mM KCl	0,2 g/L
10 mM Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L
1,76 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g/L

Pour certains usages, on ajoute à ce tampon un sel de calcium (CaCl₂) ou de magnésium (MgCl₂).

La façon la plus simple de préparer une solution de PBS est d'utiliser des comprimés commerciaux de tampon PBS. Ils sont formulés pour donner une solution de PBS prête à l'emploi après dissolution dans une certaine quantité d'eau distillée

Applications :

Le tampon phosphate a de nombreuses applications de par son isotonicité et sa non-toxicité. Il peut être utilisé comme solvant, et comme solution de rinçage. Comme il structure l'eau autour des biomolécules (protéines, protéines enzymatiques, etc.) immobilisées sur des surfaces solides, le tampon phosphate peut aussi être utilisé comme diluant pour assurer le stockage à sec de celles-ci. Ces couches minces d'eau permettent d'empêcher la dénaturation des biomolécules, ou des changements conformationnels. Il est possible d'utiliser un tampon carbonate pour assurer la même fonction, mais celui-ci est moins efficace. Le tampon

Annexe 8 : Tampon phosphate salin

phosphate peut également servir de spectre de référence en ellipsométrie lors de la mesure de l'adsorption d'une protéine, dans le cas où les protéines sont par la suite mesurées diluées dans cette même solution de PBS.

Des additifs permettent d'étendre son champ d'application. Ainsi, un mélange d'EDTA et de PBS permet de détacher des cellules amassées. En revanche, son utilisation avec des métaux bivalents peut causer un précipité. Pour ce genre d'usage, un tampon de Good est souvent plus adapté.



Résumés

Présenté par: Boutarfi Zakaria
zakariaboutarfi@gmail.com

Université Abbès Laghrour Khenchela

Acinetobacter spp : formation de biofilm et résistance aux antibiotiques

Résumé :

Acinetobacter est un coccobacille à Gram négatif immobile, très connu par son implication dans les différents types d'infections nosocomiales, à cause de sa capacité de persisté dans l'environnement hospitalier par la formation de biofilm. Il pose actuellement un problème émergent de multirésistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines

Cette étude a porté sur 33 isolats cliniques d'*Acinetobacter spp*, sur leur profil de résistance aux antibiotiques et sur leur aptitude de former des biofilm au laboratoire central de Microbiologie du CHU de Batna. Ces souches étaient isolées à partir de divers produits pathologiques et dispositifs médicaux, les isolants ont été répartis en fonction de plusieurs paramètres (la nature de prélèvements, âge, sexe, services, le profil de résistance, et la capacité de former un biofilm).

La majorité des isolats proviens des unités de soins intensifs (Brûlés 32%, Chirurgies 20 %, Réanimation 18 %). Ils présentent des taux de résistance très élevés pour toutes les molécules étudiées (sauf la colistine) dépasse ceux rapportés par d'autres études. (Imipénème 72.73 %, Pipéracilline 96.97%, Ticarcilline 96.97%, Amikacine 81.82%, Ciprofloxacine 75.76%, ...etc). avec une capacité considérable de former des biofilm, en plus la résistance à tous les antibiotiques testés était comparativement plus élevée chez les souches d'*Acinetobacter* productrices de biofilm que chez les non productrices.

Ces résultats, doivent inciter, la bonne pratique des mesures d'hygiène dans nos services hospitaliers vue que *Acinetobacter* est germe nosocomiale, et au respect du bon usage des antibiotiques par les prescripteurs et les patients afin de préserver les molécules.

Mots-clés : *Acinetobacter spp*, résistance aux antibiotiques, biofilm

Lieu d'étude :

- Laboratoire centrale de microbiologie du CHU de Batna.

Abstract :

Acinetobacter is a genus of Gram-negative non-motile bacteria, well known for his implication in deferent types of nosocomial infections due to its ability to persist in the hospital environment by biofilm formation. There is currently a problem emerging multidrug resistance to antibiotics, including β -lactams

This study involved 33 clinical isolates of *Acinetobacter* spp, their antibiotic resistance profile and their ability to formig biofilm in the central laboratory of Microbiology of the Hospital University of Batna. These strains were isolated from various pathological products and medical devices, strains were divided according to several parameters (type of sample, age, sex, services, resistance profile, and the ability to form a biofilm) .

The majority of isolates came of ICUs (Burns 32% 20% Surgery, Resuscitation 18%). They have very high resistance to all molecules tested (except colistin) exceeds that reported in other studies. (Imipenem 72.73%, 96.97% Piperacillin, Ticarcillin 96.97%, 81.82% amikacin, ciprofloxacin 75.76%, ... etc). with considerable ability to form biofilm, while resistance to all antibiotics tested was comparatively higher in *Acinetobacter* strains whos produce biofilm than in non-producers.

These results should encourage the good practice for hygiene in hospital services because *Acinetobacter* is a nosocomial germ, and to respect for the good use of antibiotics by prescribers and patients to preserve molecules

Résumé :

Acinetobacter est un coccobacille à Gram négatif immobile, très connu par son implication dans les différents types d'infections nosocomiales, à cause de sa capacité de persister dans l'environnement hospitalier par la formation de biofilm. Il pose actuellement un problème émergent de multirésistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines

Cette étude a porté sur 33 isolats cliniques d'*Acinetobacter spp*, sur leur profil de résistance aux antibiotiques et sur leur aptitude de former des biofilm au laboratoire central de Microbiologie du CHU de Batna. Ces souches étaient isolées à partir de divers produits pathologiques et dispositifs médicaux, les isolats ont été répartis en fonction de plusieurs paramètres (la nature de prélèvements, âge, sexe, services, le profil de résistance, et la capacité de former un biofilm).

La majorité des isolats proviens des unités de soins intensifs (Brûlés 32%, Chirurgies 20 %, Réanimation 18 %). Ils présentent des taux de résistance très élevés pour toutes les molécules étudiées (sauf la colistine) dépasse ceux rapportés par d'autres études. (Imipénème 72.73 %, Pipéracilline 96.97%, Ticarcilline 96.97%, Amikacine 81.82%, Ciprofloxacine 75.76%, ...etc). avec une capacité considérable de former des biofilm, en plus la résistance à tous les antibiotiques testés était comparativement plus élevée chez les souches d'*Acinetobacter* productrices de biofilm que chez les non productrices.

Ces résultats, doivent inciter, la bonne pratique des mesures d'hygiène dans nos services hospitaliers vue que *Acinetobacter* est germe nosocomiale, et au respect du bon usage des antibiotiques par les prescripteurs et les patients afin de préserver les molécules