

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences des Techniques

Et des Technologies de Bamako (USTTB)

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi



U.S.T.T-B

Faculté de Pharmacie



Année universitaire 2018-2019

Thèse N°

**Etude de la Résistance aux antibiotiques des souches
de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter
baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako.**

Presentée et soutenue publiquement le 17 /07/ 2019 devant la faculté de Pharmacie pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

Par : *M. Seth DEMBELE*

Jury :

Président : Pr Daouda Kassoum MINTA

Membres : Pr Yacouba TOLOBA
Dr Mohamed AG BARAIKA

Co-directeur : Dr Ibréhima GUINDO

Directeur : Pr Flabou BOUGOUDOGO

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE - Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA - Professeur

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN, inspecteur des finances

PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie- Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
M. Boukassoum	HAIDARA	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M. Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique

M. Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M.Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Ibrehima	GUINDO	Bactériologie virologie
Mme Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M. Kassoum	KAENTAO	Santé Publique/Bio statistiques
M. Birama Apho	LY	Santé publique
Mme. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/Bio statistiques
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Bio statistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

Mme Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
Mme Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
Mme Merepen dit Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
Mme.N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
M. yacouba	MAIGA	Bio statistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant - -

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
------------------	-----------	------------------------

M. Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sekou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HADARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Ahmed	MAIGA	Législation
Mme. Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
Mme. Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER
----------	-----	----------------------------------

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOUCO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
M. Cheik F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
------------	---------	------------------

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureima	KELLY	Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique

M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie
CHARGES DE COURS (VACATAIRES)		
M. Cheik Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Boubou	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubacary	MAIGA	Chimie organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologie médicales
Mme. Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

DEDICACES :

Je rends grâce au Seigneur **Jésus-Christ** « l'agneau immolé » qui par sa miséricorde nous sommes sauvés du jugement dernier. Oui seigneur « *je suis trop petit pour toutes les grâces et toute la fidélité dont tu as usé envers ton serviteur, car j'ai passé ce jourdain avec mon bâton et maintenant je forme deux camps* » **Genèse 32 :10**

Cantique de David. *L'Eternel est mon berger : Je ne manquerai de rien.*

Il me fait reposer dans de verts pâturages, il me dirige près des eaux paisibles.

Il restaure mon âme, il me conduit dans les sentiers de la justice, A cause de son nom.

Quand je marche dans la vallée de l'ombre de la mort, je ne crains aucun mal, car tu es avec moi : Ta houlette et ton bâton me rassurent.

Tu dresses devant moi une table, En face de mes adversaires ; Tu oins d'huile ma tête, Et ma coupe déborde.

Oui, le bonheur et la grâce m'accompagneront tous les jours de ma vie, Et j'habiterai dans la maison de l'Eternel jusqu'à la fin de mes jours. Amen ! Psaumes 23.

Je dédie cette thèse à :

Mon père : Paul DEMBELE

C'est l'occasion pour moi ton fils de te dire merci. Merci de m'avoir inscrit à l'école. Ma vie pouvait être autrement si tu n'avais pas accepté de m'affranchir des travaux champêtres pendant les périodes scolaires. Merci pour ton amour, ton soutien et tes conseils précieux. Que le Seigneur notre Dieu te donne une bonne santé et une longévité.

Ma mère : Hawa Dao

Les mots me manquent pour exprimer ma reconnaissance envers toi Mère. Merci pour les coups de bâtons doux qui ont fait de moi un homme assidu, et respectueux.

Merci pour les cours de soir à la maison qui m'ont permis de surpasser mes camarades. Merci pour les efforts fournis pour nous apprendre les gestes qui accompagnent les récitations enseignées à l'école. Certes tu m'as donné la vie mais aussi tu as contribué à la rendre plus agréable. Merci pour ton amour ta confiance et ta protection. Que le Seigneur t'accorde une longévité afin que tu puisses récolter les fruits de notre réussite.

Mon oncle : Yacouba DEMBELE

Un homme de partage, d'amour et de bonté. Merci de m'avoir hébergé ici à Bamako pour les études universitaires. Tu nous as montré à combien la famille peut-elle être précieuse. Ta générosité, tes conseils m'ont permis de me concentrer uniquement que sur l'essentiel c'est à dire étudier. Reçois ici cher oncle l'expression de ma profonde gratitude.

Ma tante : Rachel SIDIBE

Derrière tout grand homme il y a toujours une grande femme. Merci d'avoir pris soin de nous ici à Bamako. Rien ne nous a manqué pour mieux étudier. Merci pour le sacrifice consenti pour la famille. Que Dieu le tout puissant te récompense au centuple.

A tous mes oncles et tantes

Recevez mes sincères remerciements pour tout ce que vous avez fait pour ma réussite scolaire

A Mon frère Manassé DEMBELE

Tu es mon frère mais également mon ami mon confident. Merci pour le respect que tu portes à mon égard. Je n'oublierai jamais les instants agréables de notre enfance. Tu as été toujours là pour moi et ce travail est également le tien. Je demeure convaincu qu'ensemble nous

déplacerons les montagnes. Que le seigneur t'accorde une longue vie riche en prospérité en santé.

Ezekiel DEMBELE et sa Famille :

Merci pour votre hospitalité, votre amour et votre sympathie à mon égard pendant les années que j'ai passées chez vous désormais chez moi à Sikasso. Que Dieu vous récompense et vous accorde une longue vie.

Mes frères Abel, Sidiki Aggé, Eli, Timothée

La vie nous a uni et ce lien doit être plus fort afin que nous puissions triompher des moments difficiles. Merci pour votre soutien vos conseils et votre présence dans ma vie. Je prie pour que le Seigneur vous protège.

A mes sœurs Tabita, Karia, Sitan, Madeleine, et Germaine la benjamine

Juste une pensée à vous me procure une sensation de joie. Vous êtes ma famille et vous comptez énormément pour moi. Grand merci principalement à toi Tabitha notre aînée pour ta présence à mes côtés depuis mon petit âge. Je vous souhaite une longévité en parfaite santé et beaucoup de succès.

A Debora Keita :

La vie est belle que si nous la partageons avec des personnes qui nous aiment et qui sont prêtes à se sacrifier pour nous voir heureux. Merci pour ces années de confiance, d'amour et de respect.

Aux cousins : Youssouf DEMBELE, Niari dit Ba DAO, Nouhoum COULIBALY, Madou DAO,

Merci pour vos encouragements vos conseils et votre soutien multiforme.

Aux amis : Dr Sidy DIAWARA, Boubacar COULIBALY ; Josué SOGOBA, Barnabas DIARRA, Mohamed TELLY, Baba TELLY, Estelle KANGA

Merci pour votre amitié votre respect, vos conseils, les instants de bonheur que nous avons passé ensemble.

Remerciements

Mes mots de remerciements vont à l'endroit de :

Tous les étudiants thésards et news Docteurs de l'INRSP :

Dr Dicko, Dr F.I. Diallo, Dr Mahamadou Samake, Dr Aicha Diallo, Dr Ismail Traore, Dr Amadou DIENG, Dr Barnabas DIARRA, Dr SANGARE « la force tranquille », Fodé A SIDIBE, Anaby K KONDO, Guediouma SANOGO mon « fils », Maimouna DEMBELE, Jacques ARAMA, Dr Tenimba SOUNTOURA et enfin notre cher président N.Y. KEITA.

Merci pour ces années de partage, d'amour et de joie. Ces souvenirs resteront gravés dans ma mémoire. Que Dieu vous accorde une bonne carrière professionnelle et une agréable vie de famille.

Tous les personnels et stagiaires de la Bactériologie générale de l'INRSP de Bamako :

Dr Diallo, Tante Binta, tante Adama Ganaba, la tante mondiale Mme Traore Hawa SAMAKE, SANGARE « mon étudiant » et principalement à Mr Marcel KONE pour ses conseils, sa disponibilité pour la réussite de ce travail.

Tout le personnel du laboratoire IST /V.I.H de l'INRSP

Alou SANOGO Dr OMGOIBA, Youssouf TRAORE, et mention spéciale à Mr Demba pour sa disponibilité pour la réalisation de la partie PCR de cette étude.

Tous les étudiants de la 10eme promotion du numerus clausus de la FAPH de Bamako :

Le chemin a été long, mais nous voici au terme de ces six années de dure formation. Nous nous sommes soutenus mutuellement et nous avons tous franchi la ligne d'arrivée.

Merci pour chaque moment de joie que vous m'avez procuré.

Tout le personnel de la pharmacie Zone-Industrielle :

Hamidou COULIBALY, Yah TRAORE M^{me} KONE, DIARRA Adam KONE, Nianigie DAO, Birama DOUMBIA Gaoussou DOUMBIA, Noussa KONATE.

Merci pour votre patience, vos conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail et principalement au Dr **Diakaridia Coulibaly** pour son soutien et ces conseils.

A tous mes enseignants du fondamental et du secondaire

Grand merci à tous les enseignants de l'école primaire **Jilè Gnogo** de koutiala à tous les enseignants du second cycle **Collège Moderne de Sincina** principalement au Directeur et enfin à tous les enseignants du lycée **Michel Allaire de koutiala**.

Hommage aux membres du Jury :

A notre maître et président du Jury :

Professeur Daouda Kassoum MINTA

- **Professeur titulaire des maladies infectieuses et tropicales ;**
- **Directeur du centre d'excellence de lutte contre le VIH ;**
- **Chargé des cours de parasitologie et de thérapeutique à la FMOS**
- **Chercheur au DEAP/MRTC/FMOS-Mali,**
- **Président du comité scientifique VIH du Mali et de la SOMARAM.**
- **Vice président de la Société Africaine de Pathologies Infectieuses (SAPI)**

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre rigueur et votre amour du travail bien fait font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Nous vous prions de retrouver ici cher maître l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre maître et juge :

Professeur Yacouba TOLOBA

- **Professeur titulaire en pneumologie à la FMOS,**
- **Spécialiste en pneumo-phtisiologie et en allergologie,**
- **Praticien Hospitalier au CHU du Point G,**
- **Chef de DER à la FMOS,**
- **Membre de plusieurs sociétés savantes nationales et internationales.**

Cher maître,

Vous nous avez profondément marqué par votre personnalité humble, votre simplicité, votre humanisme et surtout votre disponibilité constante. Merci de nous avoir accordé une partie de votre temps et cela malgré vos multiples occupations.

A notre maître et juge :

Docteur Mohamed AG BARAÏKA

- **Pharmacien microbiologiste,**
- **Maître Assistant en bactériologie- virologie à la faculté de Pharmacie,**
- **Enseignant-chercheur au centre de recherche et de lutte contre la drépanocytose.**

Cher maître ;

Nous vous remercions infiniment d'avoir accepté de juger ce travail et de la confiance que vous portez à notre personne. Recevez ici nos sincères remerciements et notre respect.

A notre maître et co-directeur :

Docteur Ibréhima GUINDO

- **Pharmacien microbiologiste**
- **Chef du service de bactériologie –virologie à l'INRSP**
- **Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP ;**
- **Maître assistant de Bactériologie-virologie à la faculté de Pharmacie**
- **Point focal de la RAM.**

Cher maitre,

Vous avez été d'un apport indispensable à ce travail par non seulement vos qualités scientifiques mais aussi par votre soutien et encouragement infaillible. Recevez ici cher maitre nos sincères remerciements et profondes gratitudees.

A notre maître et Directeur de thèse :

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

- **Maitre de conférence Agrégé en bactériologie et virologie à la faculté de Pharmacie ;**
- **Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la faculté de Pharmacie,**
- **Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012,**
- **Officier de l'Ordre du mérite de la santé.**

Cher maître ;

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos conseils précieux, de votre écoute permanent et surtout de votre patience. Nous sommes intarissables d'éloges à votre égard et nous tenons à vous assurer toute notre admiration et notre respect.

TABLES DES MATIERES :

Introduction :	1
Objectifs	2
1 Généralités :	3
1.1 Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-nF).....	3
1.2 Taxonomie :.....	3
1.3 Caractères cultureux	4
2 Etude des deux principaux genres de bactéries à Gram négatif non fermentaires :.....	5
2.1 Genre <i>Pseudomonas</i>	5
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.3 Genre <i>Acinetobacter</i> :.....	14
3 Les antibiotiques :	22
3.1 Définition.....	22
3.2 Les bêta-lactamines :	22
3.3 Les aminosides :	23
3.4 Les Fluoroquinolones	23
4 Résistance aux antibiotiques	23
4.1 Définition :.....	23
4.2 Les mécanismes génétiques de la résistance acquise	24
4.3 La notion de "multi résistance"	25
4.4 Méthodologie de détection de la résistance aux antibiotiques :	26
4.5 Résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
4.6 Résistance chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	30
5 Matériel et Méthodes	33
5.1 Type et durée de l'étude :	33
5.2 Lieu de l'étude	33

5.3	La population de l'étude	34
5.4	Critères d'inclusion.....	34
5.5	Critères de non inclusion :	35
5.6	La taille de l'échantillon :	35
5.7	Collecte des données :	35
5.8	Variables étudiées dans cette étude :	35
5.9	Matériel :.....	36
5.10	La démarche Méthodologique :	37
6	Résultats	47
6.1	Analyse des données socio-démographiques :	47
6.2	Analyse des données bactériologiques	50
6.3	Résultats de la PCR pour la recherche des gènes de résistance aux carbapénèmes. .	60
7	Discussion	64
8	Conclusion :	70
9	Recommandations :.....	71
10	Références	72
11	Annexes	81

Liste des tableaux :

Tableau I : classification taxonomique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Tableau II : Principales pathologies causées par <i>P. aeruginosa</i> ; classées selon le site d'infection.	8
Tableau III: Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques	11
Tableau IV : Classification taxonomique d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
Tableau V : Récapitulatif des facteurs de pathogénicité chez <i>A. baumannii</i>	21
Tableau VI : Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez <i>A. baumannii</i>	32
Tableau VII : Liste des disques d'antibiotiques utilisés et leurs charges.....	40
Tableau VIII : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la recherche de carbapénèmases chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , et la détection chez <i>A. baumannii</i> du gène bla _{OXA-23} avec les amorces OXA-IMP1 et OXA-IMP2, et celle des séquences d'insertion ISAbal et ISAbal4 avec les amorces ISAbalA et ISAbalB et les amorces ISAbal4A et ISAbal4B, respectivement.....	42
Tableau IX : Composition du mélange réactionnel (Mix) utilisé pour la PCR.....	43
Tableau X : programme utilisé pour la détection des gènes de résistances aux carbapénèmes chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
Tableau XI: Distribution des deux espèces bactériennes en fonction de la nature du prélèvement.	51
Tableau XII : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées au cours de cette étude.....	54
Tableau XIII: Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Tableau XIV: Phénotypes de résistance aux aminosides des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées.	56
Tableau XV : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées.....	57
Tableau XVI: Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées.....	58
Tableau XVII : Phénotypes de résistance aux aminosides des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolées.....	59

Tableau XVIII : Caractérisation des gènes de carbapénèmases détectés en fonction de l'origine des souches *Pseudomonas aeruginosa* et de la nature des échantillons..... 61

Tableau XIX: Caractérisation des gènes de carbapénèmases détectés en fonction de l'origine des isolats d'*Acinetobacter baumannii* et de la nature des échantillons. 63

Liste des figures :

Figure 1: <i>P. aeruginosa</i> au Gram ;	Figure 2: ciliature mono triche de <i>P. aeruginosa</i> .	6
Figure 3 : Colonies pigmentées de <i>P.aeruginosa</i>	Figure 4 :Colonies non pigmentées de <i>P.aeruginosa</i>	7
Figure 5 : Facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		11
Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un biofilm		12
Figure 7 : Schéma simplifié de l'expression des facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>		13
Figure 8 : Colonies d' <i>A.baumannii</i> sur Gelose au sang		16
Figure 9 : Représentation des quatre principales classes de β -lactamines obtenues par Substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β -lactamines.		22
Figure 10 : Galérie API 20 ^E		39
Figure 11 : Vitek 2 bio- Mérieux		39
Figure 12 : Schéma de dépôt de disque pour la recherche de BLSE.....		41
Figure 13 : Thermocycleur : GeneAmp PCR system 9700 (photo prise à INRSP).....		44
Figure 14 : Répartition des isolats de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction du sexe des patients :		47
Figure 15 : Répartition des isolats d' <i>Acinetobacter baumannii</i> en fonction du sexe des patients.		48
Figure 16 : Répartition des patients en fonction des raisons de demande d'analyse.		49
Figure 17: Répartition des deux espèces selon leur fréquence d'isolement.....		50
Figure 18 : Répartition des isolats bactériens (effectif) en fonction de leur provenance.....		51
Figure 19: Antibiogramme d'une souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> multirésistante aux antibiotiques isolée à l'INRSP de Bamako.		52
Figure 20: Antibiogramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistante isolée à l'INRSP de Bamako.		53
Figure 21 : Synergie (Bouchon de champagne) entre un disque de Pipéracilline+Tazobactam et un disque d'Aztréonam sur l'antibiogramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolée au cours de notre étude : Souche productrice de BLSE.....		56
Figure 22 : Synergie (Bouchon de champagne) entre un disque de Ticarcilline +Acide clavulanique et un disque d'Aztréonam sur l'antibiogramme d'une souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> isolée au cours de notre étude : Souche productrice de BLSE.....		59

Figure 23 : Répartition des gènes de résistance aux carbapénèmes détectés chez les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , en fonction de leur fréquence.....	60
Figure 24 : Répartition des gènes de résistance aux carbapénèmes détectés chez les <i>Acinetobacter baumannii</i> en fonction de leur fréquence.	62
Figure 25 : Résultat de la PCR classique en simplex pour la recherche d'IsAba1 (taille du fragment : 389pb) des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	62
Figure 26 : Résultat de la PCR classique en simplex pour la recherche du gène BlaOxa-23 (taille du fragment : 501pb) des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	63

Liste des sigles et abréviations

°C : Degré celsius

AAC : Amino-Acétyle Transférase

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*

ADH : Arginine Déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHL : Acyl-Homoserine Lactones

AMPC : Céphalosporine

ANT : Amino Nucléotidyl-transférase

APH : Amino- phosphotransférases

API : Appareillage et Procédé d'Identification

ARN : Acide Ribo-nucléotidique

Ata : *Acinetobacter* trimeric auto-transporteur

ATB : AntibioGramme

ATM : Aztréonan

B. cepacia : *Burkholderia cepacia*

BET : Bromure d'Ethidium

BGN : Bacille à Gram Négatif

BGN-nF : Bacille à Gram négatif non Fermentaire

BLSE : Beta-lactamase à Spectre Elargi

BMR : Bactérie multirésistante

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

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

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

Cm : centimètre

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

C3G : Céphalosporine de troisième Génération

C4G : Céphalosporine de quatrième Génération

C+G : cytosine et Guanine

CTX-M : Céfotaximase-Munich

dNTPs : Desoxyribonucléotides Triphosphate

ECDC : European Center for Disease prevention and Control
EARS –Net : European Antimicrobial Resistance surveillance Network
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
F : Forward
GES : Guyana Elargi Spectrum Beta-lactamase
H Case : Céphalosporine Hyper-produite
H₂O : dihydroxyde d'oxygène.
INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique
IMP : Imipénèmase
IsAba : sequence d'insertion *Acinetobacter baumannii*
Kb : Kilobase
KPC : *Klebsiella pneumoniae* Productrice de Carbapénèmase
LDC : Lysine Décarboxylase
LPS : Lipopolysaccharide
MBL : Métallo- Bêta-Lactamase
MgCl₂ : Chlorure de magnesium
ml : millilitre
mM : millimolaire
NDM : New Delhi Métallo-bêta- lactamase
NNIS : National Nosocomial Infection surveillance
O. antropi : *Ochrobactrum antropi*
ODC : Ornithine Décarboxylase
OprD : Porine D
OmpA : *Acinetobacter* Outer protein membrane
OMV : Outer membrane vesicles
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONPG : Ortho-Nitro phényl-Galactosidase
ORL : Oto-Rhino-Laryngologie
OXA : Oxacillinase
pb : paire de bases

PCR : polymérase Chain Reaction
Ph : potentiel d'hydrogène
PLPs : Protéines Liant Pénicillines
PSE : Enzyme Spécifique de Pseudomonas
QRDR : Quinolone Resistance Determining Region
QS : Quorum Sensing
R : reverse
RNE : Resistance Non Enzymatique
S : sensible
S. maltophila : *Stenetrophonas maltophila*
SHV : Sulfhydrile
SST : System de Sécrétion de Type
TEM : Temoneira
TBE : Tris-borate-EDTA
VIM : Verona Integron-encoded Metallo-bêtalactamase
µl : Micro-litre

Introduction :

La résistance aux antibiotiques est un problème mondial (1). L'introduction des agents antibactériens sur le marché dès les années 30 a permis une révolution dans le traitement des infections bactériennes.

Aujourd'hui l'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques représentent une menace majeure de santé publique aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement (2).

Face à ce problème l'organisation mondiale de la santé a dressé en Février 2017 une liste de bactéries pour orienter et promouvoir la recherche –développement de nouveaux antibiotiques. Elle met plus en avant la menace de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* multi-résistantes (3). Ces espèces bactériennes représentent une menace particulière dans les hôpitaux, les maisons de retraite ou pour les patients dont les soins imposent d'utiliser des dispositifs comme des respirateurs ou des cathéters sanguins. Ce sont des germes opportunistes type des infections nosocomiales.

De nos jours ces bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération, les meilleurs produits disponibles pour traiter les bactéries multirésistantes.

D'où la mise en place des stratégies de surveillance de cette résistance en Europe à travers le réseau EARS-Net. Cette surveillance porte sur les cinq principales molécules (ou familles de molécules) antibiotiques actives sur ces bactéries : pipéracilline +/- tazobactam, ceftazidime, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones.

Au Mali une association Africaine pour la recherche et le contrôle de la résistance aux antimicrobiens (A.A.R.A.M.) a vu le jour en Aout 2014, mais peu de données sont disponibles de nos jours sur l'aspect moléculaire des déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques chez ces bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Etant données l'implication de ces bactéries dans les infections nosocomiales et leur multi-résistance nous nous sommes posés la question à savoir : Quel est le niveau de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* isolées en routine au Mali.

Objectifs

✓ Objectif général

Etudier la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa*; et *Acinetobacter baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako.

✓ Objectifs spécifiques:

- Déterminer la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* isolées à partir de divers produits pathologiques,
- Déterminer le phénotype de résistance des souches de ces deux espèces,
- Déterminer de façon moléculaire les gènes de résistance aux carbapénèmes des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako.

1 Généralités :

1.1 Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-nF)

Ce sont des bacilles à Gram négatif qui contrairement aux entérobactéries ne fermentent pas les sucres.

1.2 Taxonomie :

Le vaste groupe des BGN-nF a fait l'objet de nombreux rémaniements taxonomiques avec l'apport des données génomiques ayant pour conséquence l'établissement d'une classification plus précise concernant les *Pseudomonas* et apparentés et la réassignation dans de nouveaux genres ou le transfert dans des genres déjà existants.

De nouveaux genres (*Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Delftia*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*) ont été créés pour accueillir les espèces exclus.

En dehors de quelques espèces (*P.aeruginosa*) dont l'identification pose peu de problèmes, l'identification phénotypique des autres BGN-nF est restée longtemps difficile, avec le recours nécessaire à des méthodes moléculaires (séquençage des gènes *rrs* [ADNr 16S], *rpoB*, *gyrB*, *recA* etc.). La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a révolutionné l'identification bactérienne y compris celle des bacilles à Gram négatif permettant l'identification au niveau de l'espèce et au niveau du genre (ou complexe) dans respectivement 75 à 90 % et 90% à 100% de ceux-ci selon les études. Seulement environ 5% des souches testées ne sont pas correctement identifiées ou sont non identifiables par cette technique (4).

Outre la famille des *Pseudomonadaceae*, les BGN-nF comportent aussi les genres *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Alteromonas* et *Sphingobacterium*. Au sein des *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia* sont les plus retrouvées dans les infections nosocomiales.

1.3 Caractères cultureux

Ce sont des bactéries à Gram négatif aérobies stricts de culture « facile »

Ces bactéries, cultivent sur milieux ordinaires et possèdent un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminale d'électrons). A noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose (5).

2 Etude des deux principaux genres de bactéries à Gram négatif non fermentaires :

2.1 Genre Pseudomonas

2.1.1 Taxonomie

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie de la famille des Pseudomonadaceae. Cette famille renferme une dizaine de genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*.

2.2 Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, aérobic stricte, dépourvue de capsule. Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. Cette espèce, se distingue par sa grande adaptation aux différentes conditions environnementales, par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques et par la diversité de ces facteurs de virulence.

2.2.1 Classification :

Selon la 9^{ème} édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (1994),

P. aeruginosa est classée comme suit :

Tableau I : classification taxonomique de *Pseudomonas aeruginosa*.

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonaceae
Genre	Pseudomonas
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

2.2.2 Habitat :

P. aeruginosa est un germe ubiquitaire très répandu dans l'environnement qui vit habituellement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides ou à la surface des végétaux. Le bacille pyocyanique peut également survivre et se multiplier dans une infinie variété de

liquides et de milieux, sur tout type de support et de matériel humide d'où sa persistance dans l'environnement hospitalier.

Relativement rare au contact de l'homme, on le retrouve très occasionnellement sur la peau ou les muqueuses ; il peut vivre en commensal dans le tube digestif chez l'homme et chez divers animaux.

2.2.3 Caractères bactériologiques

2.2.3.1 Caractères morphologiques :

P. aeruginosa, bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fines droites de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature mono triche, et dépourvus de spores et de capsule(6).



Figure 1: *P. aeruginosa* au Gram ;

Figure 2: ciliature mono triche de *P. aeruginosa*

2.2.3.2 Caractères biochimiques

P. aeruginosa présente un métabolisme oxydatif (non fermentant), réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites.

Elle donne des réponses positives pour les tests suivants : catalase, oxydase, ADH, citrate de Simmons, et la gélatinasse et des réponses négatives pour les tests suivants : LDC, ODC, indole, βgalactosidase (quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la β-galactosidase (7)).

2.2.3.3 Caractères cultureux :

C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, par conséquent, elle peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteurs tel que le cétrimide.

P. aeruginosa est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe

entre 30 et 37°C. Elle sécrète un certain nombre de pigments, entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (Brun-rouge).

Les souches ne produisant aucun de ces pigments sont très peu nombreuses. C'est une bactérie dépourvue d'enzymes dégradant le lactose.

Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou de seringa in vitro. Il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa* :

- Les colonies larges : sont grandes, rugueuses convexes et lisses.
- Les colonies muqueuses : sont bombées, opaques visqueuses, filantes ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate. Cet aspect s'observe surtout dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose.
- Les colonies Sm (Small) : sont rondes petites, convexes et lisses.

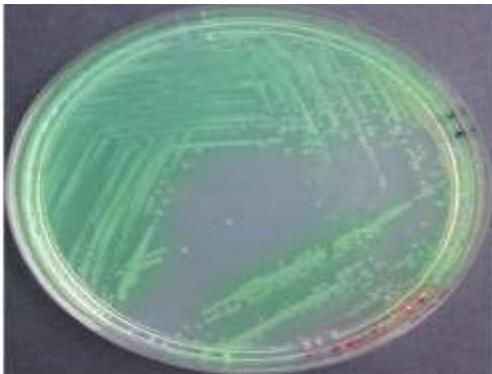


Figure 3 : Colonies pigmentées de *P.aeruginosa* Figure 4 :Colonies non pigmentées de *P.aeruginosa*

2.2.4 Pouvoir pathogènes de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est invasif et toxigène, en raison de la production de facteurs de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser, et d'envahir les tissus), et ceux sécrétés (qui endommagent les tissus et déclenchent des processus inflammatoires).

Pseudomonas aeruginosa infecte rarement les tissus sains, mais envahit aisément tous les tissus où les défenses sont compromises, ce qui explique le caractère essentiellement

nosocomial des infections qu'il provoque. Le tableau II montre les principales infections causées par *P. aeruginosa*.

Tableau II : Principales pathologies causées par *P. aeruginosa* ; classées selon le site d'infection (8).

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
tractus respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> - pneumonie aigue - infections chroniques de l'arbre bronchique -Dilatation des bronches 	Frequent (hôpital ; soins intensifs)
Sang	- bacteriemie and septicemie	Frequent
Tractus urinaire	<ul style="list-style-type: none"> - infections aigues - infections chroniques 	Relativement frequent (complications suite a la presence de corps etrangers)
Oreille	<ul style="list-style-type: none"> - otite externe « oreille du nageur » - otite externe maligne - otite moyenne chronique suppurative 	Frequent
peau et tissus mous	<ul style="list-style-type: none"> - dermatite - infections de plaie - infections de brulures 	Relativement frequent (traumatismes)
	<i>Ecthyma gangrenosa</i> <ul style="list-style-type: none"> - pyodermite - folliculite - <i>acne vulgaris</i> resistant 	patients neutropeniques
Œil	<ul style="list-style-type: none"> - keratite (ulcere corneen) - enophtalmie - ophtalmie neonatale 	rare (traumatisme)
systeme nerveux central	<ul style="list-style-type: none"> - meningite - abcès cerebral 	Rare (secondaire a une neurochirurgie ou a un traumatisme)
os et articulations	<ul style="list-style-type: none"> - pyoarthrose stenoarticulaire - osteomyelite vertebrale - infection de la symphyse pubienne - osteochondrite du pied - osteomyelite 	Rare

tractus gastro-intestinal	– enterocolite necrosante – infections perirectales	Rare
---------------------------	--	------

2.2.4.1 Cas particulier de la mucoviscidose

Pseudomonas aeruginosa est un agent pathogène opportuniste qui « colonise » l'épithélium respiratoire des patients présentant des conditions prédisposantes, telles la mucoviscidose, la ventilation mécanique, l'immunodéficience ou la présence d'une maladie pulmonaire, comme la BPCO. Son unique flagelle ainsi que ses pili sont responsables de la mobilité de la bactérie et de son adhésion à l'épithélium respiratoire.

La mucoviscidose, dont la prévalence est estimée à 0,74 pour 10 000 habitants dans l'Union Européenne fait partie des maladies rares (9) ; elle est néanmoins la plus fréquente des maladies monogéniques potentiellement graves dès l'enfance dans les populations d'origine européenne. Il s'agit d'une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive due aux mutations du gène CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), dont la plus fréquente est la mutation F508del (10).

La surinfection broncho-pulmonaire, qui se traduit par des épisodes d'exacerbations, est un problème majeur pour les malades, les deux germes les plus fréquemment responsables d'infections étant *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, fortement impliqués dans l'aggravation de l'atteinte pulmonaire(11).

L'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose conduit à l'apparition d'une dilatation des bronches avec une infection bactérienne chronique. *Pseudomonas aeruginosa*, est l'agent pathogène majeur infectant les patients mucoviscidosiques. Après l'infection initiale où l'éradication de la bactérie est possible, une infection chronique affecte environ 75 % des adultes mucoviscidosiques (12) . Son éradication est – à ce jour – quasi-impossible en cas d'infection chronique avérée.

2.2.5 Les facteurs de pathogénicité chez *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa possède et utilise un vaste arsenal de facteurs de virulence. Ces derniers lui permettant de s'adapter à différents environnements et coloniser divers types d'hôtes.

Deux classes de ces facteurs peuvent être distinguées. La première correspond aux facteurs sécrétés tels que l'exotoxine A, les phospholipases, les métallo protéases (l'élastine Las B ou Pseudo lysine, l'élastase Las A ou Staphylolysine, la protéase alcaline ou Aeruginolysine), les sérine-protéases (la protéase IV ou Arginyl peptidase, Las D), la leucocidine, les phénazines, les pyoverdines, les rhamnolipides, et les lectines.

La deuxième classe est celle des facteurs associés à la membrane de la bactérie comme le flagelle, le biofilm, le lipopolysaccharide (LPS), la protéine OprF, l'alginate, et les pili qui sont principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité. En plus de ces facteurs s'additionnent les différents systèmes de sécrétions.

Les systèmes de sécrétion sont des nanomachineries d'export présentes chez les bactéries Gram négative pour libérer des effecteurs ou encore de l'ADN à l'extérieur de leur enveloppe.

Ils sont très répandus au sein des différents génomes analysés et sont classés du SST I au

SST VI. Cependant, *P. aeruginosa* ne possède pas de SST IV.

Le SST III est le facteur de virulence majeur ; responsable de l'effet cytotoxique de cette bactérie et des infections aiguës qu'elles provoquent (13).

Elle permet à la bactérie d'injecter directement les toxines à l'intérieur de la cellule.

La translocation des toxines depuis la bactérie s'effectue en traversant la membrane bactérienne à l'aide d'un appendice ressemblant à une aiguille capable de percer la membrane de la cellule eucaryote.

Les facteurs de virulence associés à la membrane sont généralement impliqués dans la phase de colonisation et de l'infection chronique tandis que les facteurs extracellulaires, extrêmement toxiques, sont plutôt associés à l'infection aiguë.

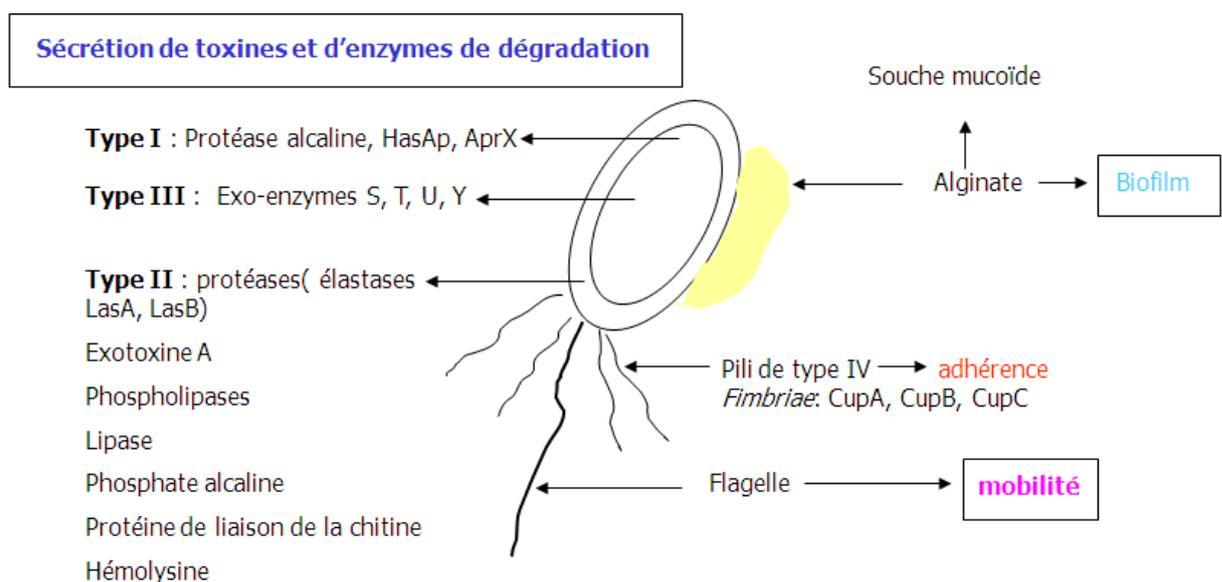


Figure 5 : Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau III: Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques (14).

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésions aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux Adhésions aux cellules trachéales Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux antibiotiques Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence
Exo enzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraine des lésions du glycopeptide, de la vimentine et des IgG et IgA
Exo enzyme U	Rôle anti phagocytose	Lésion des cellules épithéliales responsable de bactériémie voire de choc septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastase (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine Rôle important dans la virulence
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes
Pyocyanine + Pyoverdine	Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'élastase Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique.
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique

✓ **Le biofilm** :

Le biofilm est un ensemble de micro-organismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques.

Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche, interface air-liquide...) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (15).

Son établissement se fait en plusieurs étapes (Figure 6).

La première est une étape d'attachement pendant laquelle des bactéries mobiles viennent adhérer au support et perdent leurs appendices extracellulaires. Puis s'ensuit une initiation du biofilm avec surproduction d'exopolysaccharides et constitution de microcolonies. Par la suite, une formation de structures en 3 dimensions en forme de champignons s'opère : c'est la maturation du biofilm. Pour finir, le biofilm s'ouvre et disperse dans le milieu de nouvelles bactéries flagellées qui vont pouvoir recommencer le cycle en s'établissant ailleurs.

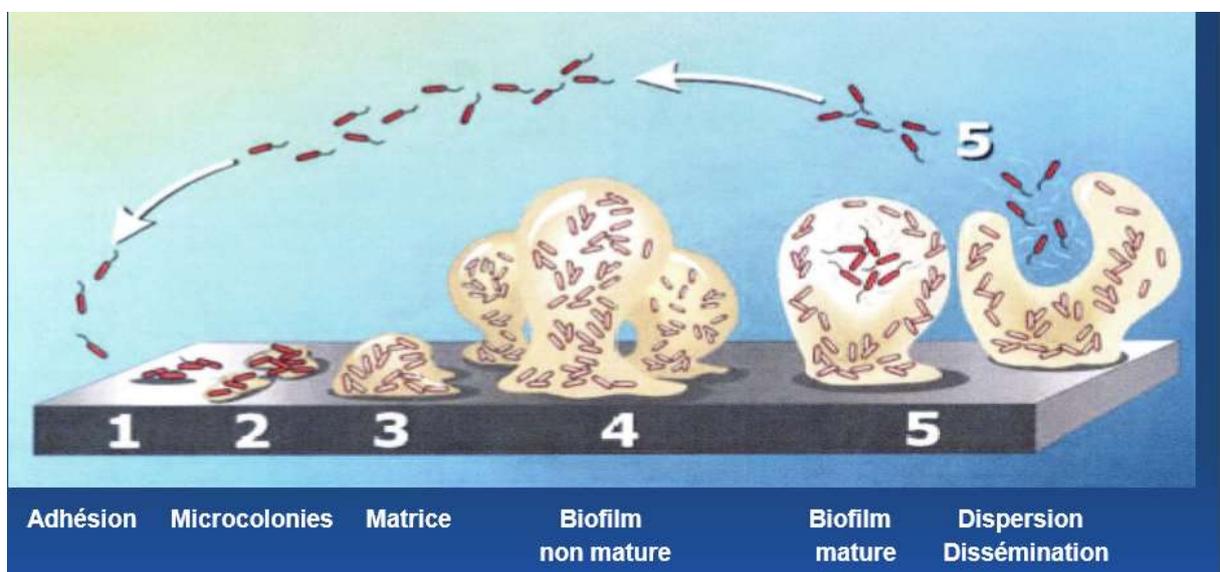


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un biofilm

2.2.5.1 Régulation des facteurs de pathogénicité chez *P. aeruginosa* :

Chez *Pseudomonas aeruginosa* l'adaptation écologique et l'expression des facteurs de pathogénicité sont sous la dépendance d'un système appelé le quorum sensing QS (16).

Ce système est fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles ce qui leur permettent de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication cellulaire repose sur la production de phéromones diffusibles des N- acyl-homoserine lactones AHL qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisés par une AHL synthétase qui est codée par un gène de type « I » (inducteur). Lorsque la concentration de ces molécules atteint un certain seuil elles se relient au régulateur transcriptionnel de type « R » (17).

Le complexe ainsi formé va activer la transcription des gènes cibles dits de virulence mais également du gène « I » d'où le terme de molécules auto-inductrices ; Six à 10% des gènes de *P. aeruginosa* qui codent pour des protéines impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux ou dans la virulence sont ainsi régulés par le quorum sensing (18).

A ce jour trois systèmes QS ont été caractérisés chez *P.aeruginosa* : il s'agit de LasR/LasI de RhIR/RhII et de 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone dénommé également Signal Pseudomonas Quinolone (PQS) qui contrôlent de nombreux facteurs de virulence (18).

Le schéma suivant illustre les différentes étapes du quorum-sensing.

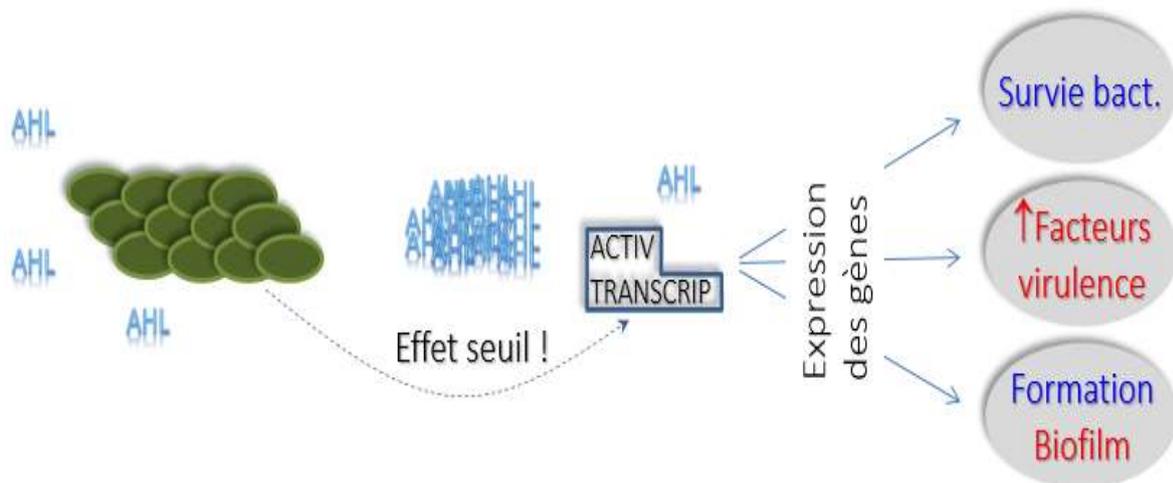


Figure 7 : Schéma simplifié de l'expression des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*

2.3 Genre Acinetobacter :

2.3.1 Historique et Taxonomie

L'histoire du genre *Acinetobacter* a débuté avec le microbiologiste néerlandais (Martinus Willem Beijerinck) qui a isolé en 1911, une souche bactérienne dénommée *Micrococcus calcoaceticus* à partir d'un prélèvement de sol enrichi dans un milieu minimum contenant l'acétate et le calcium. La caractérisation de cette souche a été poursuivie avec Brisou et Prévot en 1954, et le nom *Acinetobacter* a été proposé pour séparer les bactéries immobiles des bactéries mobiles du genre *Achromobacter* (19). Ce genre a regroupé une collection hétérogène de bactéries à Gram négatif, immobiles, à réaction d'oxydase négative ou positive. En 1971, suite aux travaux de Baumann et ses collaborateurs (20), le sous-comité pour la taxonomie des *Moraxella* et ses bactéries apparentées a déclaré que le genre *Acinetobacter* devait inclure uniquement les espèces à oxydase négative. La première étude taxonomique moderne du genre *Acinetobacter* a été réalisée par Bouvet et Grimont en 1986. Ils ont fourni une description de plusieurs espèces y compris *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* et *Acinetobacter junii* et ont modifié la description d'*A.calcoaceticus* et d'*A.lwoffii* en se basant sur des tests biochimiques, les besoins nutritifs des souches ainsi que sur des preuves d'hybridation ADN-ADN (21). La taxonomie du genre *Acinetobacter* a ainsi été confuse en raison du manque de marqueurs biochimiques capables de distinguer les espèces bactériennes. Depuis la description des premiers membres du genre *Acinetobacter*, plusieurs espèces ont été rapportées. Ce genre bactérien est formé actuellement de 71 espèces dont 53 portent des noms propres et officiels. Il convient de noter que la taxonomie de ce genre reste encore un défi aujourd'hui, surtout que les analyses phénotypiques utilisées en pratique courante dans les laboratoires de routine ne sont pas capables de détecter des différences minimales au niveau de certaines espèces (22).

C'est le cas du complexe *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* (Acb) qui comprend 6 espèces phénotypiquement très proches: *A.baumannii*, *A.pittii*, *A.nosocomialis* et *A.calcoaceticus* (23) ainsi que les nouvelles espèces *A. seifertii* et *A.dijkshoorniae* (24).

Récemment, les données du génome entier ont été incluses dans les analyses taxonomiques, et les chercheurs ont ainsi pu réussir à délimiter les espèces génomiques d'*Acinetobacter*.

Cependant, l'application de ces données sans recours aux études phénotypiques n'a jamais été validée, ni acceptée. *Acinetobacter* est une bactérie de plus en plus décrite en pathologie humaine. C'est un genre qui comprend plusieurs espèces dont la plus intéressante est l'espèce *baumannii*.

Acinetobacter baumannii a été classée comme suite en 1986 par Bouvet et Grimont

Tableau IV : Classification taxonomique d'*Acinetobacter baumannii*

<i>REGNE</i>	<i>BACTERIA</i>
<i>EMBRANCHEMENT</i>	PROTEOBACTERIA
<i>CLASSE</i>	GAMMA PROTEOBACTERIA
<i>ORDRE</i>	PSEUDOMONADALES
<i>FAMILLE</i>	MORAXELLACEAE
<i>GENRE</i>	ACINETOBACTER
<i>Especie</i>	<i>Baumannii</i>

2.3.2 Morphologie du Genre Acinetobacter

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des gamma-protéobactéries, bacilles ou coccobacilles (souvent en diplobacille ou diplocoque) à Gram négatif (parfois résistant à la décoloration). Leur diamètre varie de 0.9 à 1.6 nm et leur longueur de 1.5 à 2.5 µm.

Elles ne produisent pas de spores et apparaissent au microscope sous la forme de courts bacilles ou de Cocci (en phase stationnaire). Immobile et sans flagelle, ils peuvent cependant se déplacer grâce à des structures polaires ressemblant à des fimbriaes de 5 nm de diamètre et de 10 à 15 nm de long (25). Ils sont non sporulés et en général très polymorphe avec des formes filamenteuses dans les cultures âgées.



Figure 8 : Colonies d'*A.baumannii* sur Gelose au sang

(Image obtenue sur <http://www.slideshare.net/alfredobambang/acinetobacter-28595602>)

2.3.3 Habitat :

Les espèces d'*Acinetobacter* vivent non seulement dans l'environnement, elles sont aussi des commensales chez l'homme où on estime que jusqu'à 25% des populations sont porteur d'*Acinetobacter* spp (26) .

Elle est fréquemment isolée au niveau de la flore intestinale, ORL et de la flore cutanée (zone humide).

2.3.4 Caractéristiques biochimiques.

Les *Acinetobacter* sont des bactéries présentant des réactions de catalase positive et d'oxydase négative, et n'ont pas la capacité de métaboliser les sucres par les voies fermentaires (27). Par ailleurs, la majorité des tests biochimiques utilisés habituellement en bactériologie clinique sont négatifs : indole, réduction des nitrates en nitrites, décarboxylase pour la lysine (LDC), décarboxylase pour l'ornithine (ODC), production d'hydrogène sulfuré (H₂S), bêta-galactosidase et DNase. Les tests de l'uréase, l'hydrolyse de la gélatine ou la phénylalanine désaminase (PAD) donnent quant à eux des réponses variables.

2.3.5 Caractères cultureux

Acinetobacter cultive sur les milieux non sélectifs (gélose trypticase soja) à une température de 30-37°C (*A. baumannii* se développe à 44°C contrairement aux autres espèces). Leur isolement est possible sur les milieux sélectifs des bactéries à Gram négatif (SS, Hektoen, Drigalski ; Mac conkey...). Un Ph compris entre 5,5 et 6 favorise leur croissance.

Les caractères morphologiques observés au microscope permettent de distinguer les *Acinetobacter* des autres bacilles à Gram négatif (notamment les entérobactéries qui sont aussi oxydase négatif) *Acinetobacter* est aérobie strict (métabolisme respiratoire).

2.3.6 Pouvoir pathogène d'*Acinetobacter baumannii* :

2.3.6.1 *Acinetobacter baumannii* et infections associées aux soins

Au sein du genre *Acinetobacter*, *A. baumannii* est devenu au cours de ces dernières décennies un agent pathogène cliniquement pertinent, impliqué dans un large éventail d'infections. Néanmoins, le rôle des *Acinetobacter* non *baumannii* dans les infections humaines est de plus en plus reconnu, et cela grâce à l'introduction dans les laboratoires des techniques de biologie moléculaire, permettant une identification fiable des bactéries au niveau de l'espèce (27).

Les facteurs de risque prédictifs d'acquisition de ces infections sont : une sélection exercée par les antibiotiques, un score de sévérité élevé à l'admission, une augmentation de la durée de séjour et essentiellement l'utilisation de la ventilation mécanique (28).

2.3.6.2 Pneumopathies

Les pneumopathies chez les patients ventilés représentent aujourd'hui les infections à *A. baumannii* les plus fréquentes en unités de soins intensifs. Une étude américaine du National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) a rapporté 5 à 10 % de pneumopathies dues à *A.baumannii* dans les unités de soins intensifs (29). *A. baumannii* peut également être à l'origine de pneumonies communautaires, survenant surtout en zone tropicale (Asie et Australie). Ces infections sont fréquemment observées chez l'homme et sont associées avec des facteurs de risque comme l'âge, le tabagisme, l'alcoolisme, la bronchite chronique, le diabète, le cancer et les antécédents de pneumonie. Les pneumonies communautaires sont généralement fulminantes, avec un taux de mortalité qui peut dépasser les 60% en raison d'un retard de prise en charge thérapeutique adaptée (30).

2.3.6.3 Infections de la peau et des tissus mous

A. baumannii est responsable de près de 2% des infections de la peau et des tissus mous acquises dans les unités de soins intensifs. D'autre part, *A. baumannii* a également été retrouvé chez les patients issus des zones de conflits armés tel qu'en Iraq, et Afghanistan. Il était le germe le plus fréquemment isolé des victimes de guerre ayant des fractures ouvertes de tibia. Récemment, des souches multi-résistantes ont été isolées des plaies des blessés de guerre en Syrie et hospitalisés à l'hôpital gouvernemental de Tripoli, Nord du Liban (31).

2.3.6.4 Infections urinaires

A. baumannii peut être impliqué mais rarement dans les infections urinaires. Selon une étude, il serait responsable de moins de 2% des infections urinaires acquises dans les services de soins intensifs. L'infection est en lien avec la présence d'une sonde urinaire (32).

2.3.6.5 Méningites

Les méningites nosocomiales post chirurgicales causées par des souches multi-résistantes d'*A.baumannii* ont été rapportées (33). La mortalité peut être aussi élevée 70%, bien que sa cause soit souvent difficile à discerner (34).

2.3.6.6 Autres manifestations

A. baumannii peut être la cause d'endocardites dont la majorité est liée à l'utilisation de valves prothétiques. Il peut aussi être à l'origine de péritonites, d'ophtalmies ou encore de kératites post chirurgies (22).

2.3.7 Mode de transmission

La transmission d'*A.baumannii* est souvent due à une contamination de l'environnement hospitalier, à une dissémination aérienne et aux patients colonisés. Le manuportage est le principal mode de transmission. Les sites environnementaux contaminés sont souvent ceux situés à proximité des patients colonisés, comme par exemple les oreillers, le linge de lit, les appareils de ventilation, les éviers, les poignées des portes, les claviers des ordinateurs, les équipements de nettoyage... (35).

Les mains des personnels de soins peuvent aussi être colonisées par des souches épidémiques d'*A.baumannii* facilitant par conséquent la transmission aux patients. Des études épidémiologiques ont montré que le pourcentage de colonisation des mains des infirmiers et les médecins variait de 3 à 23% (36).

2.3.8 Les facteurs de virulence d'*Acinetobater baumannii* :

Le séquençage complet des génomes de plusieurs souches d'*A.baumannii*, le développement des outils de manipulation des génomes pour créer des mutants ainsi que l'utilisation des modèles animaux ont joué un rôle crucial dans l'identification et la compréhension des facteurs contribuant à la pathogenèse de cette espèce. Ci-dessous sont développés les principaux facteurs de virulence décrits chez *A. baumannii*.

2.3.8.1 La protéine de la membrane externe OmpA

L'un des facteurs de virulence les plus caractérisés chez *A. baumannii* est la protéine de membrane externe OmpA, qui est la protéine de surface la plus abondante.

OmpA est impliquée dans l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales et contribue à la dissémination d'*A.baumannii*.

En outre, cette protéine permet aux bactéries de persister et se développer dans le sérum humain en évitant les voies du complément (37) et facilite la formation des biofilms (38).

2.3.8.2 Le Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS), composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif joue un rôle potentiel dans la pathogenèse chez *A. baumannii*. En effet, il a été montré que des mutants de LPS, présentaient une atténuation de la résistance au sérum humain ainsi qu'une diminution de survie dans un modèle d'infection des tissus mous chez les rats (39).

2.3.8.3 -La capsule

La capsule est considérée comme un facteur de virulence car elle peut jouer un rôle important dans la protection des bactéries à la réponse immunitaire innée de l'hôte (40).

2.3.8.4 Les phospholipases

Les phospholipases bactériennes sont des enzymes lipolytiques assurant le clivage des phospholipides. Ces enzymes contribuent à la pathogenèse des bactéries Gram négatif en catalysant le clivage des phospholipides présents dans la membrane cellulaire et dans les barrières muqueuses afin de faciliter la lyse cellulaire et l'invasion bactérienne (41).

2.3.8.5 Les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif sont extrêmement diversifiés du point de vue fonction et composition et sont considérés comme des médiateurs importants de virulence. Des recherches récentes ont pu élucider plusieurs mécanismes par lesquels les *Acinetobacter* pouvaient sécréter les protéines ainsi que leurs rôles dans la pathogenèse de ces bactéries (40). Les vésicules de membrane externe (Outer Membrane Vesicle, OMV) sont des nanovésicules sphériques identifiées chez les bactéries Gram négatif. Elles sont composées de LPS, de protéines de membrane externe, de protéines périplasmiques, protéines cytoplasmiques, lipides, d'ADN et d'ARN (41).

Les OMVs contribuent à la pathogenèse en transportant des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules hôtes, en facilitant le transfert horizontal des gènes et en protégeant la bactérie contre la réponse immunitaire de l'hôte (42). *A. baumannii* secrète des OMVs lors des infections. Les OMVs sont aussi capables de transférer des gènes de résistance, comme cela a été montré pour le gène *blaOXA-24-like*, suggérant par conséquent un rôle de ces vésicules dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques (43).

L'Ata ou *Acinetobacter* trimeric autotransporteur est une autre protéine qui facilite l'adhérence d'*A.baumannii* à certains composants de la matrice extracellulaire tel que le collagène et est impliqué dans la formation des biofilms.

2.3.8.6 L'acquisition de fer

Le fer est un élément important pour les bactéries mais n'est pas facilement disponible chez l'hôte, car il se trouve complexé avec l'hème, la lactoferrine et la transferrine. *A.baumannii* acquiert le fer en exprimant des systèmes de capture et d'utilisation de l'hème (44) ;

En outre, il est capable d'acquérir le fer *via* les sidérophores. Parmi eux, l'Acinetobactine est le sidérophore le plus caractérisé (45).

2.3.8.7 Formation de biofilm

A. baumannii a une capacité remarquable de survivre et prospérer en milieu hospitalier en raison de ses interactions avec différents types de surface y compris les surfaces abiotiques telles que les meubles, les drapes et les équipements médicaux (cathéters, équipements respiratoires) (22).

L'adhérence d'*A.baumannii* aux surfaces biotiques et abiotiques aboutit à la formation des biofilms. Par conséquent, la formation de ces biofilms est un facteur de virulence qui contribue à la pathogénicité d'*A.baumannii*. Ce processus est régulé par une large gamme de facteurs bactériens tels que les *pili*, les protéines de la membrane externe (OmpA), la production d'exopolysaccharides, le système de régulation à deux composants BfmRS (46), mais également d'autres facteurs cellulaires et environnementaux, y compris les molécules de signalisation du quorum sensing, la température, la lumière et la disponibilité en fer (41).

2.3.8.8 Quorum sensing

Le quorum sensing contribue à la pathogénicité des *Acinetobacter* en contrôlant l'expression des gènes et en favorisant la formation des biofilms et par conséquent la survie et la résistance aux antibiotiques (47).

Tableau V : Récapitulatif des facteurs de *pathogénicité* chez *A. baumannii*

Facteurs de virulence	Protéines	Rôle dans la pathogénèse
Protéine de la membrane externe	OmpA	Induction de l'apoptose des cellules cibles, adhérence et invasion des cellules épithéliales, formation de biofilm, mobilité de surface, survie dans le sérum
Lipopolysaccharide		Evasion de la réponse immunitaire de l'hôte, déclenchement de la réponse inflammatoire
Capsule		Evasion de la réponse immunitaire, croissance dans le sérum
Phospholipases	C/D	Survie dans le sérum, dissémination de la bactérie, apoptose des cellules cibles
protéines liant les pénicillines	PLP 7/8	Biosynthèse de peptidoglycane, stabilité cellulaire, croissance dans le sérum
Les systèmes de sécrétion	OMV	Transfert des facteurs de virulence et des matériels génétiques dans le cytoplasme des cellules,
	T2SS	Production de lipases, virulence atténuée en cas des mutations
	Ata	Adhérence, formation des biofilms
Acquisition de fer	Siderophore	Survie chez l'hôte, apoptose cellulaire
Formation de biofilms		Survie en milieu hospitalier sur les surfaces biotiques et abiotiques
Quorum sensing		Survie chez l'hôte, formation des biofilms

3 Les antibiotiques :

3.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances naturelles élaborés par des micro-organismes. Il existe des antibiotiques semi-synthétiques ou synthétiques. Ils sont bactériostatiques ou bactéricides à faible dose. Leurs cibles sont des structures moléculaires essentiellement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (48).

Les antibiotiques sont regroupés en plusieurs familles.

3.2 Les bêta-lactamines :

Les bêta lactamines représentent 65% des antibiotiques du marché mondial dont 50 molécules sont commercialisées (49).

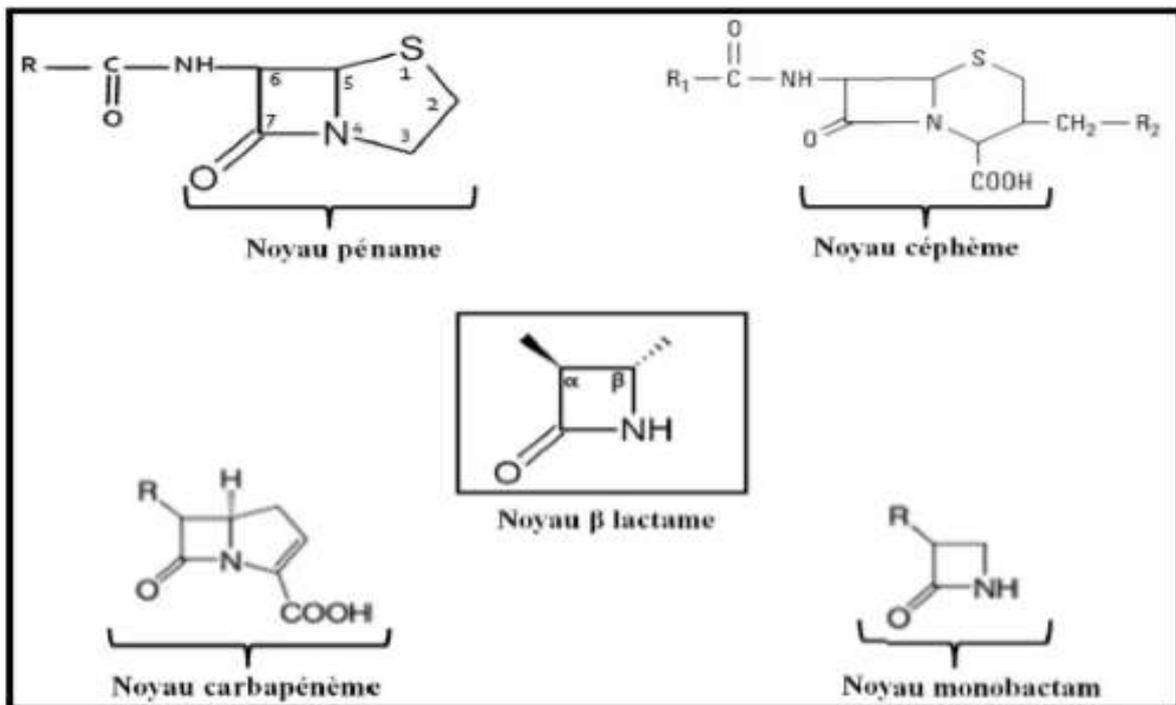


Figure 9 : Représentation des quatre principales classes de β -lactamines obtenues par Substitution ou fixation d'hétérocycles à partir du noyau β -lactamines.

3.3 Les aminosides :

Les aminoglycosides (sucres aminés) sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol (cycle à 6 chaînons avec des groupements aminés), auquel se lient par des ponts glycosidiques 2 (ou exceptionnellement 3 dans la néomycine) hexoses (50).

3.4 Les Fluoroquinolones

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique, qui dérivent d'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués. Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4.

Les fluoroquinolones, ainsi appelées car contenant un atome de fluor en position 6, dérivent de la quinoléine (51).

4 Résistance aux antibiotiques

4.1 Définition :

Une souche bactérienne est dite « résistante » quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (52). Autrement dit, les souches qui supportent des concentrations critiques d'antibiotiques plus élevées que celles qu'ils sont possibles d'atteindre in vivo.

Il existe deux types de résistance :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes). Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif entraîne une résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glucopeptides, macrolides ; lincosamides streptogramines etc)

A côté de la résistance naturelle existe aussi des résistances acquises ; il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée.

La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance acquise résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce.

4.2 Les mécanismes génétiques de la résistance acquise

Le potentiel génétique d'une bactérie est constitué du chromosome et d'un ou de plusieurs génophores facultatifs et extra-chromosomiques, les plasmides. Des gènes sont également portés par des éléments génétiques transposables et par des intégrons. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique.

4.2.1 La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique. Mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). C'est un phénomène indépendant : l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible ; elle est permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles). Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique.

4.2.2 La résistance extra-chromosomique :

✓ Plasmides :

Les plasmides sont constitués de molécules d'ADN bicaténaire extra-chromosomique, circulaire, se répliquant de façon autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations.

Deux faits expliquent l'importance de la résistance plasmidique :

1/ la résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique.

2/ de nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ce qui permet un transfert horizontal ; ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou d'infectieuse".

✓ **Transposons**

Les transposons sont des éléments mobiles d'ADN (gènes sauteurs) capables de se transférer entre un chromosome et un plasmide ou encore entre deux plasmides

✓ **Les intégrons**

Les intégrons sont de nouveaux éléments génétiques contenant un ou plusieurs gènes de résistance sous formes de cassettes. Les cassettes sont des unités mobiles qui peuvent être facilement intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase présente sur l'intégron.(53)

4.2.3 Résistance biochimique.

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques en :

- Se rendant imperméables à leur pénétration.
- Produisant des enzymes capables de les inactiver.
- Modifiant la structure de leurs cibles.

4.3 La notion de "multi résistance"

Il s'agit d'une terminologie très couramment utilisée même si elle ne répond pas à une définition univoque. Il est d'usage de parler de multi résistance face à "une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique" (54) ou face à "une bactérie sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques". La multi résistance peut donc être acquise, mais aussi naturelle, comme par exemple pour *Burkholderia cepacia*, ou à un moindre degré pour *Acinetobacter* spp. Au total, ce terme s'emploie généralement pour une bactérie qui pose en général un problème de ressource thérapeutique.

La **panrésistance** est la résistance à la totalité des antibiotiques disponibles (55).

4.4 Méthodologie de détection de la résistance aux antibiotiques :

Lorsque l'on veut définir la catégorie clinique d'une souche, la méthode de référence est la détermination de la CMI. Des valeurs critiques sont aussi disponibles pour interpréter les résultats de l'antibiogramme.

Il est cependant possible d'identifier l'existence d'un mécanisme de résistance par d'autres méthodes.

✓ Méthodes phénotypiques :

Détection directe d'enzymes de dégradation (test de recherche de bêta-lactamases), recherche sélective sur des géloses contenant l'antibiotique à des concentrations supérieures aux valeurs critiques, modification du milieu ou des conditions d'incubation pour augmenter l'expression de la résistance, confirmation de la présence de bêta-lactamase par l'utilisation d'inhibiteurs tels que l'acide clavulanique ou l'EDTA...

✓ Les méthodes génotypiques

Permettent de détecter les déterminants génétiques de la résistance. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est classiquement utilisée. La PCR est une technique de biologie moléculaire, d'amplification génique in vitro. Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de développer des puces à ADN qui peuvent détecter un large panel de gènes de résistance (56).

4.5 Résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.1 La résistance naturelle

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas inhibée par le clavulanate. Cette résistance naturelle peut être due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire.

4.5.2 La résistance acquise aux betalactamines :

4.5.2.1 Résistance enzymatique

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou métallo-enzymes (classe B) dont les substrats sont des β -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle β -lactame (57).

4.5.2.1.1 Résistance par hyperproduction de la céphalosporines AmpC :

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Ambler, ce sont des sérine-enzymes. Le mécanisme le plus fréquent est une hyperproduction constitutive de l'AmpC. La surproduction constitutive de l'enzyme AmpC affecte principalement l'activité de la ticarcilline, de l'association pipéracilline/tazobactam, de la Ceftazidime, de l'Aztréonam et dans une moindre mesure du Céfépime. Habituellement, l'enzyme est produite en petites quantités. Toutefois, la production d'AmpC chez *P. aeruginosa* peut augmenter de 10 à 1000 fois (58).

L'hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC permet à *P. aeruginosa* de résister à toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Son action échappe à l'action des inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique ou tazobactam.

4.5.2.1.2 Résistance par production de β -lactamases de classe A

✓ Pénicillinases

On distingue dans la classe A, les pénicillinases et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les pénicillinases décrites : PSE-1 (enzyme spécifique de *Pseudomonas*) encore dénommée CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-2 et CARB-4.

Toutefois, PSE-1 est la pénicillinase majoritaire (90% des cas). Ces enzymes sont étroitement liées, la seule différence est 1 ou 2 acides aminés (59).

Ces pénicillinases hydrolysent les Carboxypénicillines, les Uréidopénicillines et la cefsulodine, et sont inactives sur la Ceftazidime et les carbapénèmes.

✓ Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes récemment apparues à la suite des mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques. Elles sont très actives sur les pénicillines et moyennement actives sur les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (Ceftazidime et Cefotaxime) et les monobactames (Aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les Cephamicines (Céfoxitine) ni les Carbapénèmes (60). Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez

P. aeruginosa. Ces enzymes sont habituellement détectées par une synergie entre une C3G (notamment la Ceftazidime) ou l'Aztréonam et l'acide clavulanique aspect en « bouchon de champagne » sur un antibiogramme.

La diffusion des gènes de la classe A des BLSE joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques, et peut limiter ainsi les possibilités de traitement des infections causées par *P. aeruginosa*.

4.5.2.1.3 Résistance par production de β -lactamases de classe B

Les enzymes de ce groupe sont également connues sous le nom de carbapénémase ou métallo- β -lactamase (MBL) en raison de la présence d'un ou deux atomes de Zn^{2+} dans leur site actif pour hydrolyser des β -lactamines (61). Seul le monobactam est épargné par les caractéristiques hydrolytiques des MBL. L'activité enzymatique des carbapénémases n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif. L'isolement des MBL transférables est en revanche, de plus en plus fréquent. Il existe de nombreuses variétés de MBL regroupées dans plusieurs familles : VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM (62).

4.5.2.1.4 Résistance par production de β -lactamases de classe D

Les oxacillinases sont des pénicillinases dont le spectre s'est étendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres cas aux carbapénèmes. Chez *P. aeruginosa*, les BLSE dérivées d'OXA-10 et OXA-2 ont été isolées (OXA10, 11, 14, 15,16, 19) ainsi que la β -lactamase OXA-18. Ces enzymes sont localisées sur des plasmides (sauf OXA-18). Ils hydrolysent la plupart des β -lactamines, y compris les céphalosporines, l'imipénème et le Méropénème. L'Aztréonam et la pipéracilline sont moins touchés, mais leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam (63).

L'OXA-18 est la seule β -lactamase de classe D inhibée par l'acide clavulanique identifié chez *P. aeruginosa*. Bla_{OXA-18} est localisé au niveau de chromosome (64).

Les carbapénémases de type OXA présentent une grande diversité de séquences protéiques, mais ont un spectre d'activité assez proche. En l'absence d'autres mécanismes de résistance (autres β -lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes (65).

4.5.2.2 Résistance non enzymatique chez *Pseudomonas aeruginosa* :

- ✓ Perte de la porine D2 chez *P. aeruginosa*

Le principal mécanisme par lequel *P. aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années et est présent en France chez 15 à 20 % des souches. Cette perte de porine est en effet responsable d'une augmentation de la CMI, rendant la souche intermédiaire ou résistante aux carbapénèmes. Lorsqu'elle s'accompagne de l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, ou de l'hyper-expression du mécanisme d'efflux mexAB-oprM, les CMI peuvent être encore plus élevées (66).

✓ Surexpression de système d'efflux

Le système MexAB-OprM, cause une résistance naturelle à la plupart des β -lactamines ; par dépression génétique. Il occasionne une résistance acquise à ces molécules. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais, suite à des mutations, peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent (67).

4.5.3 Résistance aux Aminosides

Le mécanisme majeur de la résistance aux aminosides repose sur la modification enzymatique de certains groupements chimiques de ces antibiotiques. Trois classes d'enzymes ont été décrits chez *P. aeruginosa* : les N-amino-acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des fonctions $-NH_2$, les O-phosphotransférases (APH) et les O-nucléotidyltransférase (ANT) qui permettent respectivement la phosphorylation et la nucléotidylation des fonctions-OH (57). La modification des AAC participe à la résistance de cette espèce à la plupart des aminosides utilisés en thérapeutique (gentamicine, Tobramycine, Nétilmicine et Amikacine) (68) . Pour les APH le niveau de résistance du bacille pyocyanique augmente pour la kanamycine et la néomycine. Enfin, les ANT confèrent une résistance à la streptomycine, la Spectinomycine, la gentamicine et la Tobramycine (69).

4.5.4 Résistance aux fluoroquinolones :

La résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est due à la présence de mutation dans les Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR), des gènes codant les cibles et à la surexpression du système d'efflux (70). Les mutations dans les QRDR des gènes gyrA et gyrB, parC et ParE affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles. Chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous unités gyrB et parC est peu fréquente. Elle conduit à une résistance modérée aux fluoroquinolones. Par contre, les

mutations dans le gène *gyrA* sont plus fréquentes et sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de la ciprofloxacines (CMI de 1 à 64 mg/L) (71).

4.6 Résistance chez *Acinetobacter baumannii*

4.6.1 Résistance naturelle :

A. baumannii a une capacité exceptionnelle à accumuler différents mécanismes de résistance aux antibiotiques qui, combiné avec sa résistance innée à la dessiccation, contribuent à sa survie et à sa persistance sous la pression sélective de l'environnement, ce qui fait de ce micro-organisme un pathogène nosocomial phénoménal (47).

Les souches sauvages de *A. baumannii* produisent une β -lactamase de type céphalosporinase (ou AmpC) non inductible, désignée également « *Acinetobacter-derived cephalosporinases* » (ADCs). Cette enzyme est capable d'hydrolyser de façon naturelle la pénicilline G, l'amoxicilline et les céphalosporines de première et deuxième générations.

4.6.2 Résistance acquise aux betalactamines :

4.6.2.1 Résistance enzymatique

4.6.2.1.1 Résistance par production de céphalosporinase Amp C

Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii* liés principalement à la production de β -lactamases.

A. baumannii produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céfalotine) ou des Carbapénèmes. L'insertion d'une séquence spécifique ISAbal en amont du gène *blaAmpC* favorise l'expression de cette β -lactamase de type AmpC en fournissant des séquences promoteur ce qui entraîne la résistance à la Ceftazidime (72).

4.6.2.1.2 Bêtalactamases à spectre élargi :

Chez *A. baumannii* les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques (73) ; Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *A.baumannii*, Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la Ceftazidime et l'Aztréonam. Les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégron comme gènes cassettes (VEB-1, IBC-1, GES-1, GES-3) et donc sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase (57).

Les BLSE de type GES ont aussi été décrites chez *A. baumannii*, certains variants comme GES-11 et surtout GES-14 pouvant conférer une résistance à toutes les β -lactamines, incluant

les carbapénèmes (74). Plus récemment, la BLSE la plus répandue dans le monde, CTX-M-15, a été identifiée chez *A. baumannii* (75).

4.6.2.1.3 Métallo- β -lactamases de classe B

Les β -lactamases de classe B « Appelée métallo- β -lactamases (MBLs) » confèrent une résistance aux carbapénèmes, elles sont inhibées par l'EDTA (76).

Les déterminants des MBLs les plus décrits chez *A. baumannii* sont les dérivés de type IMP, VIM, SIM et NDM. Un des derniers déterminants décrits, NDM-1 (New-Delhi Métallo- β -Lactamase), a notamment largement été médiatisé et son importante capacité de dissémination cause un réel problème de santé publique (77).

✓ **Carbapénèmases de classe D**

Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méthiciline, cloxacilline et la Benzylpénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl (78).

Des oxacillinases aux propriétés de carbapénèmases sont identifiés chez *A. baumannii*, ces oxacillinases sont de trois grands types : OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des Carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression (78).

4.6.2.2 Mécanismes de résistance non-enzymatiques

4.6.2.2.1 Modification de PLPs

L'efficacité des bêta-lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison antibiotique / cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique (79).

4.6.2.2.2 Surexpression du système d'efflux

Les pompes à efflux illustrent un phénomène unique dans la résistance aux médicaments : un seul mécanisme provoquant la résistance contre les différentes classes d'antibiotiques.

A. baumannii possède une pompe à efflux AdeABC dont les substrats sont : Aminoglycosides, les tétracyclines, l'érythromycine, le chloramphénicol, la triméthoprim, les fluoroquinolones, les bêta-lactamines, et encore récemment, la tigécycline (80).

4.6.3 Résistance aux aminosides

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certaines enzymes de modification,

Les trois types d'enzymes inactivant les aminosides ont été décrits chez *A. baumannii* : aminoside acétyltransférase AAC, aminoside nucléotidyl-transférase ANT, aminoside Phosphotransférase APH. On a décrit depuis 1988 la production d'enzymes : APH (3')-I, APH (6), AAC (3)-I, ANT (2'')-I et APH (3')-IV (81).

Récemment, la méthylation de l'ARNr 16S par la protéine codée par le gène *armA* a été décrite au Japon, en Corée de Sud et aux Etats-Unis (22).

Tableau VI : Enzymes d'inactivation des aminosides les plus communes chez *A. baumannii*

Enzymes	Noms	Substrats préférentiels
Acétylases	AAC (3) -I	Gentamicine
	AAC (3) -II	Gentaminine, Netilmicine, Amikacine
	AAC (6') -I	Tobramycine, Netilmicine, Amikacine
	AAC (6') -II	Gentamicine, Tobramycine, Netilmicine
Adénylases	ANT (2'') -I	Gentamicine, Tobramycine
	ANT(3'')(9)	Streptomycine, Spectinomycine
Phosphorylases	APH (3') -I	Kanamycine, Néomycine
	APH(3')-VI	Kanamycine, Néomycine, Amikacine, isépamicine
Méthylases	AmA	Gentamicine, Tobramycine, Amikacine

4.6.4 Résistance aux fluoroquinolones

Acinetobacter est naturellement résistant à l'acide pipémidique, mais était sensible à l'acide nalidixique jusque dans les années 1970. Les mécanismes de résistances décrits sont liés à des mutations dans la cible des quinolones que sont les topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV) et notamment au sein de courtes régions répétées (Quinolone Resistant Determinant Region). Ces mutations se situent au niveau des gènes codant pour une sous-unité de l'ADN gyrase, ou pour une sous-unité de la topoisomérase IV, ParC (82). Les mutations dans le gène *parC* interviennent dans des souches où *gyrA* est déjà muté entraînant des niveaux de résistance très élevés à la ciprofloxacine. La résistance plasmidique aux quinolones a été récemment mise en évidence en Chine (83).

La surexpression des systèmes d'efflux de type RND (*AdeABC*, *AdeIJK*) et MATE (*AbeM*) contribue également à l'acquisition de résistance aux quinolones.

5 Matériel et Méthodes

5.1 Type et durée de l'étude :

Notre étude était de type prospective longitudinale et s'est déroulée de janvier 2018 à Avril 2019 soit 15 mois. La période d'échantillonnage était de 13 mois (Janvier 2018 à Février 2019).

5.2 Lieu de l'étude

Notre étude a eu lieu à l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) de Bamako.

-Description de l'INRSP

L'Institut National de Recherche en Santé Publique de Bamako est situé à l'hippodrome en commune II du district de Bamako.

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P- RM du 28 Février 2006, modifié par

L'ordonnance N°2019-011/P-RM DU 27 Mar.2019 portant création de l'Institut National de Santé Publique (INSP) et lieu et place de L'INRSP.

Ses missions se résument comme suit :

- De veiller à l'application du Règlement sanitaire international(RSI) 2005 et à la mise en œuvre du programme de Sécurité sanitaire mondiale au Mali ;
- De contribuer au développement d'une capacité nationale de veille sanitaire et de la surveillance épidémiologique ;
- De développer une capacité nation en matière de vaccinologie ;
- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- De promouvoir la Recherche médicale et pharmaceutique en santé publique ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;

- Assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
- Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;

L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :

- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDR) qui se compose de :

Service de biochimie clinique

- o Service de parasitologie
- o Service de sérologie
- o Service d'hématologie
- o Service de bactériologie-virologie.

Le service de bactériologie-virologie est équipé de toutes les commodités permettant la recherche et l'analyse bactériologique et virologique des échantillons de routine. Ce service nous a servi de lieu pour l'analyse de nos échantillons.

5.3 La population d'étude

La population d'étude était constituée des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* émanant des produits pathologiques des patients sans distinction d'âge et de sexe.

5.4 Critères d'inclusion

Nous avons retenu dans notre étude les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* des échantillons suivants : Expectations, pus, urines sperme, lait maternel et les liquides de ponction (liquide d'ascites, liquide pleural)

5.5 Critères de non inclusion :

Nous n'avons pas retenu dans notre étude les mêmes espèces bactériennes citées ci-haut isolées dans d'autres échantillons.

5.6 La taille de l'échantillon :

Cette étude a porté sur un total de 75 souches bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii*.

5.7 Collecte des données :

Les données des patients telles que les raisons de demande de l'examen, la nature du prélèvement, l'âge, le sexe, la provenance des échantillons, ont été obtenues à partir des bulletins d'examen des patients. Ces données ont été enregistrées sur Excel pour une analyse ultérieure.

5.8 Variables étudiées dans cette étude :

Pour atteindre les objectifs que nous nous sommes assignés les variables suivantes ont été sélectionnées :

✓ **Données sociodémographiques :**

-L'âge, et le sexe des patients.

✓ **Données bactériologiques :**

- La nature des prélèvements,
- La provenance des échantillons (hospitalier, communautaire),
- Les espèces identifiées (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*)
- Les résultats de l'antibiogramme des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii*.
- Les résultats de la Recherche des gènes de résistance.

La présente étude a comporté deux parties :

- La première partie était consacrée à la bactériologie classique : isolement, identification et antibiogramme des deux espèces concernées par l'étude ;
- La deuxième partie : Recherche moléculaire des gènes de résistance aux carbapénèmes des souches résistantes à l'Imipénème et au Meropénème.

5.9 Matériel :

5.9.1 Souches étudiées :

Les souches étudiées étaient celles de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* isolées pendant la période d'étude.

5.9.2 Matériels essentiels :

✓ Matériels utilisés pour l'isolement des germes

-microscope

-bec bunsen

-Pipettes de pasteur

-Boites de pétri

-Anse de platine

-Etuve

-Sachets anaerobies

✓ Matériels utilisés pour l'identification des souches et l'antibiogramme

-Galérie API 20E

-Automate Vitek2 bio-Mérieux

-pince

-Disques d'antibiotiques

-Tubes à hémolyse

-Embouts

-Lames porte-objet et lamelles

✓ Matériels utilisés pour la conservation des souches, réactifs et amorces.

-Réfrigérateur

-congélateur (-20°C) et (-80°C)

-le bouillon glyciné

✓ **Milieux de culture**

Milieux de culture solides

Gélose chocolat

Gélose Drigalski

Gélose Mueller-Hinton

✓ **Milieux de culture liquide :**

Bouillon cœur-cervelle

✓ **Reactifs**

Reactifs de la catalase, d'oxydase

Reactifs complémentaires de l'API 20E

Colorant de Gram

➤ **Matériel et consommables utilisés pour la réalisation de la PCR :**

Les amorces, le thermocycleur, la plaque PCR, les pipettes, les embouts, la balance à précision, le micro-onde, la plaque de révélation, les reactifs du mix, le bac à électrophorèse, les peignes, le générateur de courant, hotte, les microtubes, l'ermeyer, le becher.

5.10 La démarche Méthodologique :

5.10.1 Analyse bactériologique

Les échantillons ont été analysés selon la démarche méthodologique suivante :

5.10.2 Prélèvements des échantillons :

➤ **Examen cyto-bactériologique des expectorations** : (ECBC)

Les expectorations sont des sécrétions qui viennent des poumons. Les prélèvements d'expectoration ont été effectués le matin, à jeun, après une désinfection de la bouche, afin d'éliminer la flore bactérienne buccale.

Examen cyto-bactériologique des urines : (ECBU)

Le milieu de jet, représentatif de l'urine vésicale, est recueilli dans un récipient stérile de façon à éviter sa contamination par la flore commensale de l'urètre chez l'homme, et chez la femme, par la région génitale externe.

Le prélèvement est de préférence réalisé au moins 4 heures après la miction précédente, afin de permettre une stase suffisamment longue dans la vessie.

➤ **Examen cytbactériologique du Pus :**

Nous avons utilisé un écouvillon pour les suppurations superficielles et une seringue pour les suppurations profondes tout en respectant l'asepsie

➤ **Examen cytbactériologique des liquides de ponctions** (liquide d'ascite, liquide pleural...)

Ce prélèvement est fait par un médecin formé après désinfection cutanée. Le recueil (≥ 3 ml) est réalisé dans un tube stérile ou dans une seringue, qui sera fermé correctement et l'échantillon est acheminé rapidement au laboratoire.

➤ **Examen cytbactériologique du lait maternel et du sperme**

Le lait maternel et le sperme ont été prélevés de la manière la plus aseptique possible dans un récipient stérile fourni par le laboratoire.

5.10.3 Culture et Isolement des bactéries :

La mise en culture a été réalisée sur des milieux de culture non selectifs (geloses enrichie et ordinaire) et selectifs (hektoen ou drigalski) à la temperature de 37° C pendant 24 à 48 heures et sous CO₂ pour les geloses enrichies. La gelose lactosée de drigalski nous a permis d'isoler les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Sur ce milieu nous pouvons distinguer les colonies qui fermentent le lactose (colonies jaunes) et les colonies qui ne le fermentent pas (colonies vertes ou bleues)

5.10.4 Identification bacterienne :

L'identification des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* a été faite de façon semi manuelle à la galerie API 20^E et confirmé sur l'automate vitek2 bio-Mérieux.



Figure 10 : Galérie API 20^E

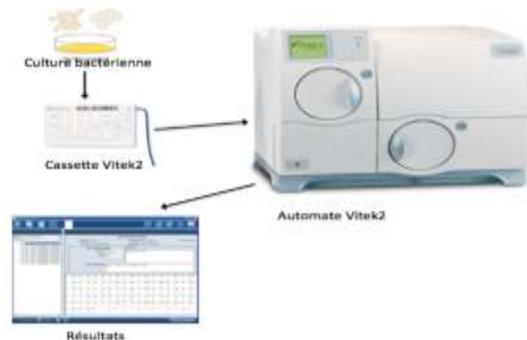


Figure 11 : Vitek 2 bio- Mériex

L'automate Vitek 2 bio-Mériex permet à partir d'une suspension bactérienne de densité standardisée d'automatiser l'inoculation, l'incubation la lecture et l'interprétation des tests. Il existe différentes cartes selon la famille de germes à identifier. Chaque carte de test en plastique est remplie de milieux spécifiques déshydratés contenus dans un maximum de 64 puits individuels. Les résultats obtenus entre 3 et 18 heures sont ensuite comparés à la base de données informatisées et l'identification est rendue avec un score de fiabilité exprimé en pourcentage. L'appareil test en même temps la sensibilité de la bactérie identifiée aux antibiotiques.

➤ **Galérie API 20^E**

La galérie API 20^E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture.

5.10.5 Test de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme

L'antibiogramme des souches a été réalisé sur la gélose Mueller Hinton selon la méthode de Kirby Bauer interprété suivant les recommandations du comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie (CA-SFM version 2018).

Les géloses ont étéensemencées par inondation à partir d'une suspension de germes de densité égale à 0,5. Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes ont été mises à incubation pendant 18 à 24 heures à 37°C. À l'aide d'une règle graduée en mm, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés par deux fois, puis interprétés en

Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R). Dans cette étude les souches interprétées comme intermédiaires ont été classées « résistantes ».

Tableau VII : Liste des disques d'antibiotiques utilisés et leurs charges

<ul style="list-style-type: none"> • Beta-lactamines Pénicillines Ticarcilline : 75µg Piperacilline : 75 µg Tiarcilline+Ac clavulanique : 75/10 µg Piperacilline + Tazobactam 75/10 µg • Céphalosporines Ceftazidime : 30 µg Cefepime : 30 µg • Carbapénèmes Imipénème : 10 µg Meropénème : 10 µg • Monobactam Aztréonam : 30 µg 	<ul style="list-style-type: none"> • Aminosides Amikacine : 30 µg Gentamicine : 15 µg • Quinolones Ciprofloxacine : 5 µg Levofloxacine : 5 µg Norfloxacine : 10 µg Ofloxacine : 5 µg • Cyclines Tigecycline : 15 µg Doxycycline : 30 µg • Autres Colistine : 50 µg
--	---

5.10.5.1.1 Recherche de la production de bêta-lactamases à spectre élargie (BLSE)

Nous avons recherché la production de bêtalactamase à spectre élargie (BLSE).

Elle se traduit par une synergie entre un disque de céphalosporines de C3G (ceftazidime) ou C4G (céfépime) ou d'aztréonam et un disque de ticarcilline ou de piperacilline associé à un inhibiteur de bêta-lactamases (acide clavulanique, tazobactam). Les disques ont été déposés de la manière suivante chacun à 3 cm de disque contenant l'inhibiteur.

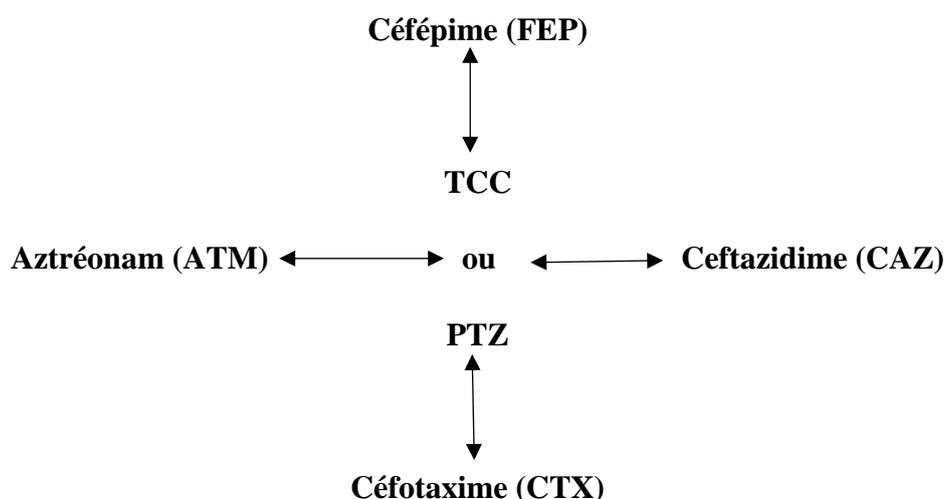


Figure 12 : Schéma de dépôt de disque pour la recherche de BLSE

5.10.6 Conservation des souches :

Les souches ont été purifiées par passage successive sur le milieu de culture « tryptica-soja » et conservées dans de bouillon glycérimé (4 part d'inoculum bactérien pour 1 part de bouillon) à moins 20°C pour la réaction de PCR.

5.10.7 Recherche par PCR classique des gènes de résistances aux carbapénèmes :

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* résistantes aux carbapénèmes (imipénème / méropénème) ont été retenues et remises en culture pour la recherche des gènes impliqués dans la résistance aux carbapénèmes.

5.10.7.1.1 Technique d'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée par choc thermique libérant ainsi l'ADN. Le procédé était le suivant :

- Remise en suspension dans 200 µl d'eau distillée stérile quatre à cinq colonies bien isolées de la culture bactérienne.
- Chauffer le mélange par ébullition pendant 10 minutes.
- Ensuite, le centrifuger à 12 000 tours par minute pendant 10 minutes.

Le surnageant, ultérieurement obtenu est récupéré et utilisé comme matrice d'ADN.

5.10.7.1.2 Réconstitution des amorces :

Les amorces ont été reçues au laboratoire à l'état lyophilisé à la concentration de 10 nmol. Nous les avons reconstitués pour obtenir une concentration de travail de 10mM en procédant ainsi :

- Centrifugation des amorces avant d'ouvrir les tubes pour un meilleur dépôt du lyophilisat au fond du tube,
- Ajout de 100 µl d'eau de PCR pour obtenir des concentrations de 100mM d'amorce, (solutions mères)
- Dilution au 1/10 des solutions mères d'amorce pour obtenir des solutions filles de 10mM (solutions de travail)

Tableau VIII : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la recherche de carbapénèmases chez *Pseudomonas aeruginosa*, et la détection chez *A. baumannii* du gène bla_{OXA-23} avec les amorces OXA-IMP1 et OXA-IMP2, et celle des séquences d'insertion ISAbal et ISAbal4 avec les amorces ISAbal1A et ISAbal1B et les amorces ISAbal4A et ISAbal4B, respectivement.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Désignation	Séquence (5'→3')	Type d'amorce	Size (Pb)	Tm	Réf
GES-1(F) GES-1(R)	CTATTACTGGCAGGGATCG CCTCTCAATGGTGTGGGT	<i>Bla</i> _{GES}	594pb	55°C	(84)
IMP-A IMP-B	GAAGGCGTTTATGTTCATAC GTACGTTTCAAGAGTGATGC	<i>Bla</i> _{IMP}	587pb	54°C	
VIM2004A VIM2004B	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	<i>Bla</i> _{VIM}	382pb	54°C	
KPC(F) KPC(R)	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTACTGCCCGTTGACGCCCA	<i>Bla</i> _{KPC}	880pb	52°C	
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
OXA-IMP1 OXA-IMP2	GCAAATAMAGAATATGTSCC CTCMACCCARCCRGTCAACC	<i>Bla</i> _{OXA-23}	501pb	58°C	

ISAbal _a	ATGCAGCGCTTCTTTGCCAGG	ISAbal	389pb	57°C	(85)
ISAbal _b	AATGATTGGTGACAATGAAG				
ISAbal _{4a}	ATTTGAACCCATCTATTGGC	ISAbal ₄	611pb	40°C	
ISAbal _{4b}	ACTCTCATATTTTTTCTT				

5.10.7.1.3 Préparation du mélange réactionnel (Mix) :

Le volume et la concentration finale de chaque réactif à utiliser ont été déterminés en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée. Le mélange réactionnel a été calculé pour l'ensemble des isolats à tester. Il a été préparé en ajoutant les réactifs les uns après les autres : H₂O – Tampon – Mgcl₂ – dNTPs – Amorces sens et anti sens – Tag polymérase. Le mélange réactionnel a été ensuite redistribué entre le témoin négatif (eau de PCR), témoin positif « témoin maison » et l'ADN des échantillons à amplifier. La réaction de PCR a été réalisée dans des microtubes de plaque de 0,1 ml pour un volume réactionnel de 25µl dont la composition est donnée dans le tableau suivant :

Tableau IX : Composition du mélange réactionnel (Mix) utilisé pour la PCR

Réactifs	Concentration [] initiale	Volume µl
Eau	-	14,25
Tampon	10X	2,5
Mgcl ₂	25 Mm	2
DNTPs	10 Mm	0,5
Amorces sens	10 Mm	1,5
Amorce anti-sens	10 Mm	1,5
Tag polymérase	5U	0,25
Répartition du mix	-	22,5
ADN	-	2,5
Total		25 µl

5.10.7.1.4 Parametrage du thermocycleur :



Figure 13 : Thermocycleur : GeneAmp PCR system 9700 (photo prise à INRSP)

Le paramétrage a consisté à intégrer les programmes d'amplification dans le thermocycleur. Les différentes étapes d'amplification de l'ADN se déroulent par cycles successifs dans un thermocycleur programmé manuellement. Les paramètres variables sont : le temps, les températures de chaque étape d'amplification notamment la température d'hybridation ainsi que le nombre de cycles. Nous avons utilisé le thermocycleur « GeneAmp PCR system 9700 » pour l'amplification des gènes de résistance aux carbapénèmes selon le programme suivant :

Tableau X : programme utilisé pour la détection des gènes de résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii*.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Désignation	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	94	300	1
Dénaturation	94	60	30
Hybridation	-	60	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	300	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>			
Désignation	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	94	300	1
Dénaturation	95	30	

Hybridation	-	40	35
Elongation	72	30	
Elongation finale	72	360	1

5.10.7.1.5 Révélation des fragments de gènes recherchés :

- **Préparation du gel d'agarose :**

Nous avons utilisé un gel d'agarose à 2% (m/v) soit 2 g de poudre d'agarose dissous dans 100 ml de solution de TBE (Tris-borate-EDTA) à 1X. Le mélange a été chauffé au four à micro-onde pendant environ 3 minutes jusqu'à ébullition et obtention d'une phase homogène limpide. Puis dans l'agarose refroidie (50 °C dans un bain mari) encore liquide, 5µl de bromure d'éthidium a été ajoutés. La solution obtenue a été coulée dans un support sur lequel était fixé un peigne formant les puits nécessaires au dépôt des amplicons obtenus après la PCR.

- **Dépôt des échantillons**

Après une heure de polymérisation environ, le gel a été placé dans la cuve à électrophorèse, contenant le tampon d'électrophorèse (TBE). Le dépôt des échantillons a été réalisé selon le procédé suivant :

Chaque puits a été chargé avec 2,5 µl d'amplicons et 2,5 µl de tampon de charge coloré au bleu de bromophénol.

Pour chaque peigne, un puits a été également chargé avec 5 µl de marqueur de poids moléculaire d'ADN (2Kb), comportant plusieurs fragments d'ADN de taille connue et servant d'échelle de repères. Un courant électrique de 80 volts a été appliqué à la cuve pendant 60 minutes.

- **Visualisation des produits de PCR**

Après la migration, le gel et son support ont été retirés de la cuve. Le gel a été placé sur une plaque de révélation. Les produits d'amplification ont été visualisés par fluorescence du bromure d'éthidium sous ultraviolets à 312 nanomètres. La photo du gel a été ensuite prise.

5.10.8 Traitement et analyse des données et saisie

Les données ont été enregistrées sur Excel version 2016 et analysée à l'aide du logiciel IBM SPSS version 20. La rédaction a été faite sur Word 2016.

5.10.9 Considérations éthiques

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un travail de routine. Nous avons veillé tout au long de l'étude au respect de la confidentialité des données et l'anonymat des patients.

5.10.10 Diagramme de Kantt

Périodes activités	Année 2018												Année 2019						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
Révue littéraire	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Protocole			■	■	■	■													
Activités Paillasse bactériologique	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
PCR															■	■			
Analyse données																	■		
correction																		■	
soutenance																			■

6 RESULTATS

6.1 Analyse des données socio-démographiques :

Au cours de la période de notre étude à l'INRSP, un ensemble de 583 bactéries a été isolé. Parmi lesquelles *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* ont représenté 13% (n = 75) des souches. D'autres espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*...) ont été isolées mais n'ont pas été prises en compte.

L'analyse des données socio-démographiques des patients infectés montre :

➤ L'âge moyen des patients :

La moyenne d'âge des patients infectés par *Pseudomonas aeruginosa* dans cette étude a été $42,24 \pm 23,50$ avec des extrêmes de 0 à 85 ans, et celle des patients infectés par *Acinetobacter baumannii* a été $50,94 \pm 17,11$ avec des extrêmes de 25 à 78 ans.

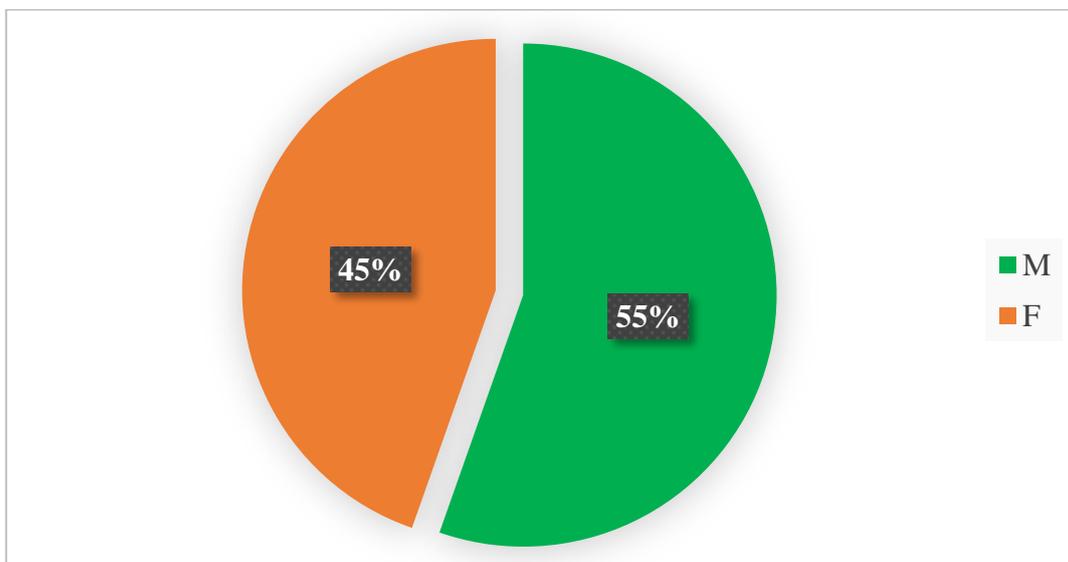


Figure 14 : Répartition des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction du sexe des patients :

Le sexe masculin était le plus touché par l'infection due à *Pseudomonas aeruginosa* avec une fréquence de 55% soit un sexe ratio H/F de **1,24**.

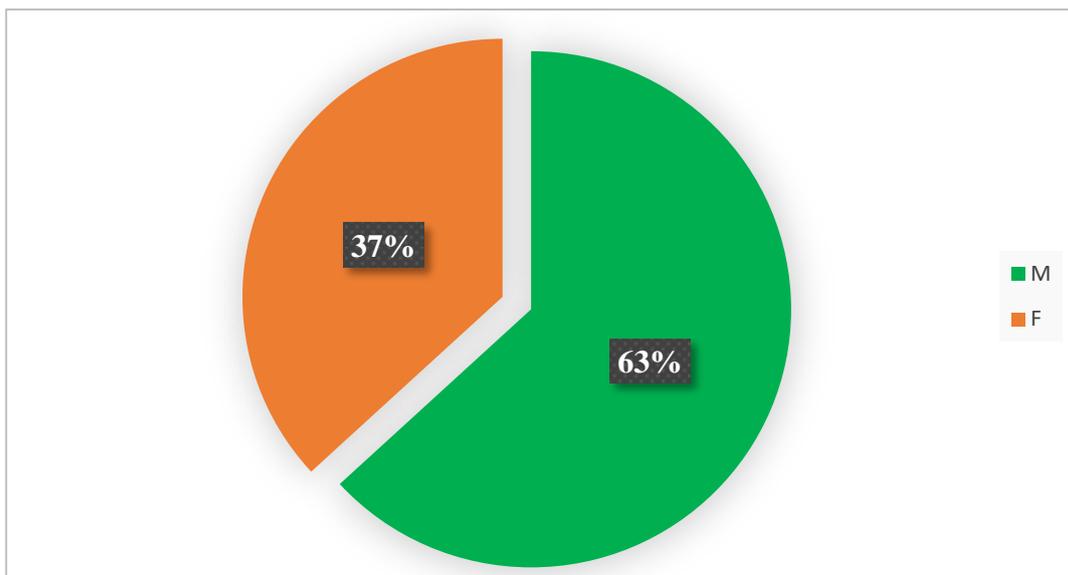


Figure 15 : Répartition des isolats d' *Acinetobacter baumannii* en fonction du sexe des patients.

Les patients du sexe masculin ont été plus les touchés par l'infection à *A. baumannii* dans notre étude avec une fréquence de 63% soit un sexe ratio H/F de 1,71.

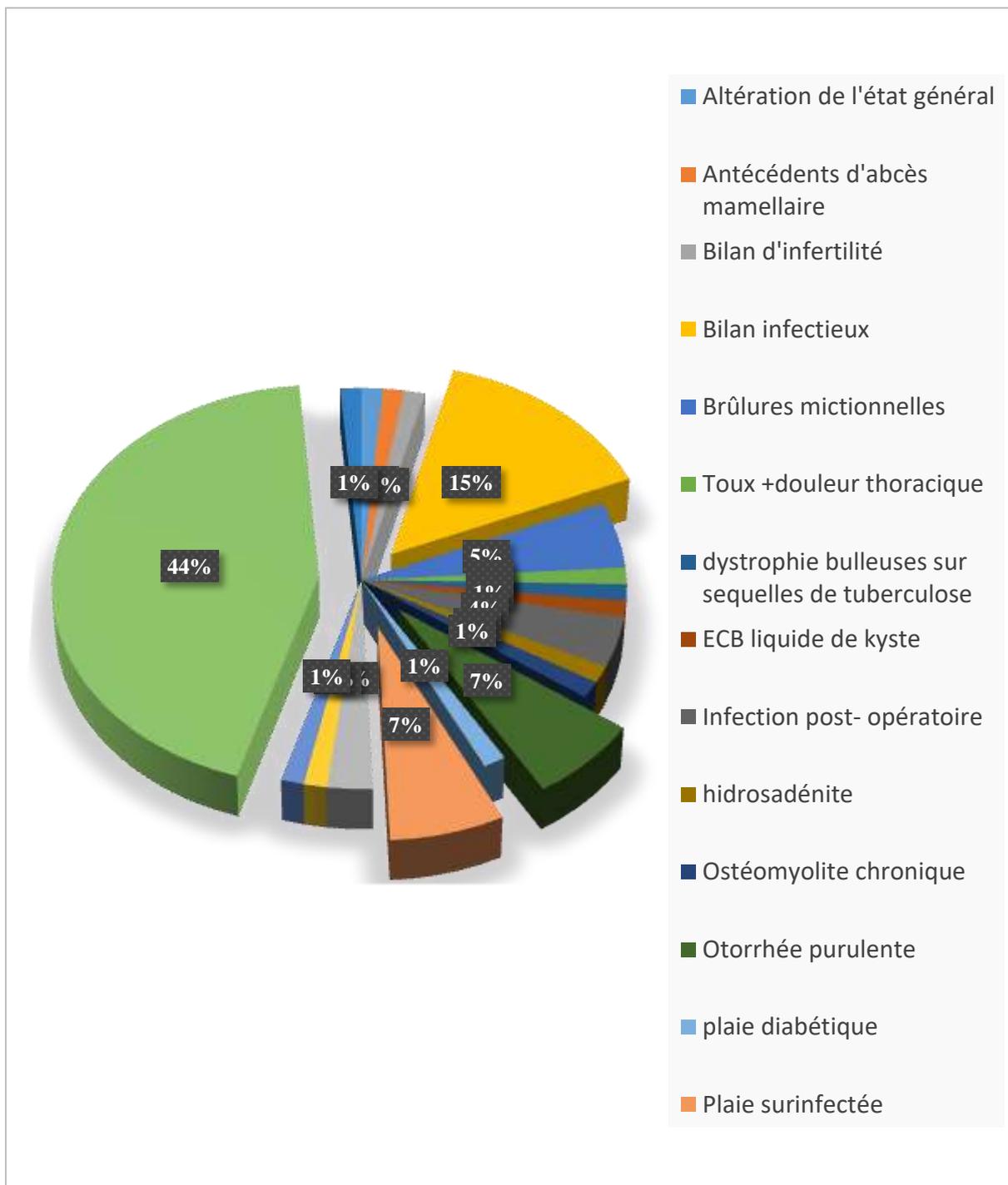


Figure 16 : Répartition des patients en fonction des raisons de demande d'analyse.

Les raisons de demande d'analyse les plus couramment retrouvées dans notre étude étaient « Toux productive chronique » à hauteur de 44%

6.2 Analyse des données bactériologiques

Nous avons isolé les deux espèces bactériennes recherchées *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* pendant cette étude et avons constaté une différence de fréquence d'isolement entre les deux germes.

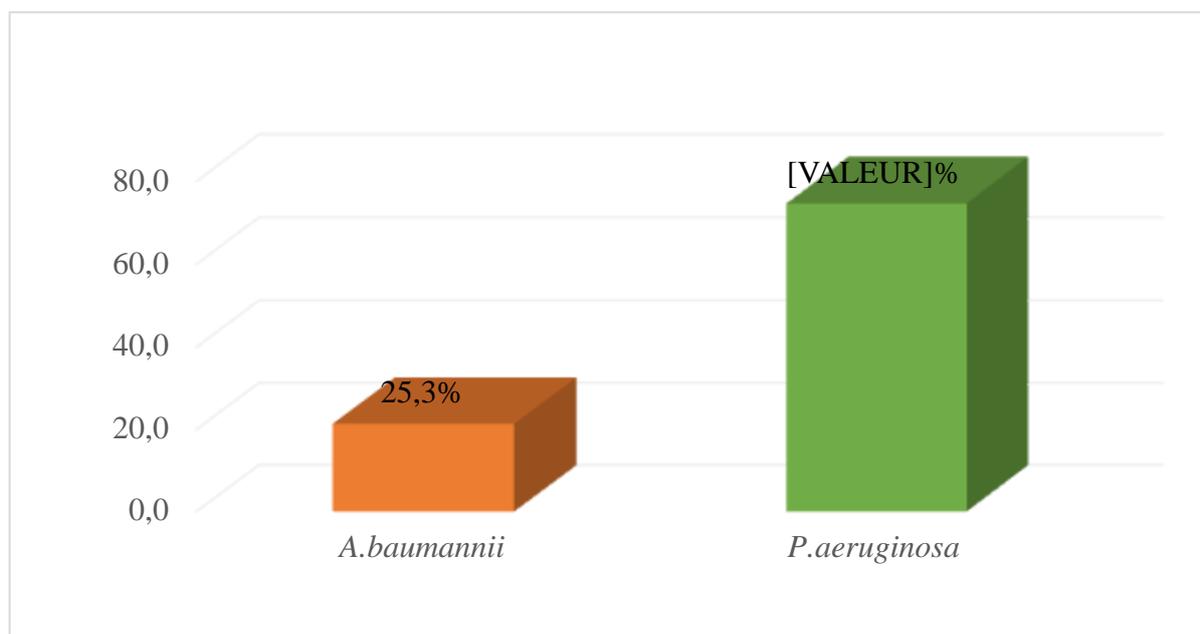


Figure 17: Répartition des deux espèces selon leur fréquence d'isolement.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a eu un effectif plus important dans notre étude (56/75) soit 74,7% comparée à celui d'*Acinetobacter baumannii* (19/75) soit 25,3%.

Au cours de cette étude nous avons isolé des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans des échantillons des patients provenant des hôpitaux ou de la communauté.

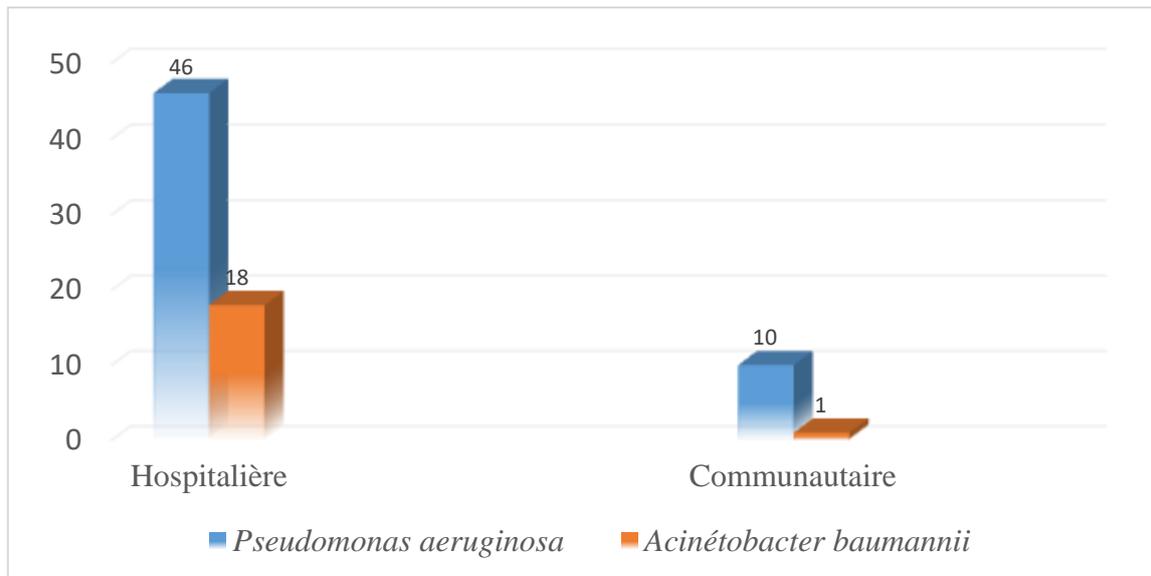


Figure 18 : Répartition des isolats bactériens (effectif) en fonction de leur provenance

Les isolats de ces deux espèces bactériennes ont été obtenus en grande partie des échantillons de source hospitalière avec respectivement 46/56 soit 82,14% et 18/19 soit 94,74% pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Tableau XI: Distribution des deux espèces bactériennes en fonction de la nature du prélèvement.

ESPECES	TYPE				
	EXPECTORATION	LAIT MATERNEL	PUS	SPERME	URINE
<i>A.baumannii</i>	11	1	3	1	3
<i>P.aeruginosa</i>	28	0	15	0	13
TOTAL	39	1	18	1	16

Les expectorations étaient les échantillons les plus représentés avec 28/56 souches de *Pseudomonas aeruginosa* soit 50% et 11/19 souches d'*Acinetobacter baumannii* soit 57,9%.

Résultats de l'antibiogramme

Les souches bactériennes ont été testées aux antibiotiques potentiellement actifs.



Figure 19: Antibiogramme d'une souche d'*Acinetobacter baumannii* multirésistante aux antibiotiques isolée à l'INRSP de Bamako.

ATM : Aztréonam, **LVX** : Levofloxacin, **TGC** : Tigécycline, **AKN** : Amikacine,

PIP : Pipéracilline, **NOR** : Norfloxacin, **PPT** : Pipéracilline+Tazobactam,

MEM : Méropénème, **DO** : Doxycycline, **CN** : Gentamicine, **CIP** : Ciprofloxacine,

FEP : Céfépime, **CS** : Colistine, **TCC** : Ticarcilline+Acide clavulanique, **OFX** : Ofloxacine

CFS : Cefsulodine.

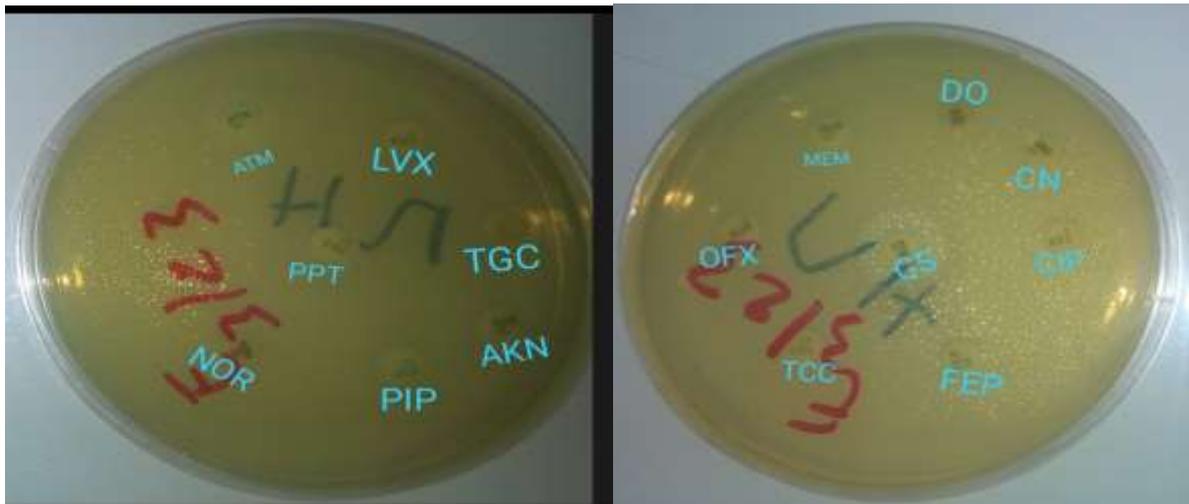


Figure 20: Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistante isolée à l'INRSP de Bamako.

ATM : Aztréonam, **LVX** : Levofloxacin, **TGC** : Tigécycline, **AKN** : Amikacine,

PIP : Pipéracilline, **NOR** : Norfloxacine, **PPT** : Pipéracilline+Tazobactam,

MEM : Méropénème, **DO** : Doxycycline, **CN** : Gentamicine, **CIP** : Ciprofloxacine,

FEP : Céfépime, **CS** : Colistine, **TCC** : Ticarcilline+Acide clavulanique, **OFX** : Ofloxacine

CFS : Cefsulodine

6.2.1 Résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau XII : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au cours de cette étude

Antibiotiques	Résistants (n%)	Sensibles
BETALACTAMINES		
TIC	26(46,4%)	30(53,6%)
TCC	24(42,8%)	32(57,2%)
PIP	23 (41,1%)	33(58,9%)
PTZ	19(34%)	37(66%)
CAZ	13 (23,2%)	43(77%)
IPM	6(10,7%)	50(89,3%)
MEM	5(8,9%)	51(91,1%)
ATM	12(21,4%)	44(78,6%)
FEP	13(23,2%)	43(76,8%)
AMINOSIDES		
AK	11(19,6%)	45(80,4%)
CN	15(26,8%)	41(73,2%)
FLUOROQUINOLONES		
CIP	12(21,4%)	44(78,6%)
LVX	12(21,4%)	44(78,6%)
OFX	17(30,3%)	39(69,7%)
CYCLINES		
DO	38(67,8%)	18(32,2%)
AUTRES		
CS	00(00%)	56(100%)

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté un niveau de résistance élevé aux pénicillines notamment à la Ticarcilline avec une résistance de 26(**46, 4%**). Une nette amélioration de l'activité des pénicillines a été observée avec l'association au tazobactam (Pipéracilline + tazobactam) qui a enregistré 19(**34%**) de résistance. Cependant les meilleurs beta-lactamines restent les carbapénèmes avec 6(**10,7%**) ; 5(**8,9%**) de résistance respectivement pour l'imipénème et le méropénème.

Tableau XIII: Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Phénotypes	Effectif	Pourcentage
Sauvage	25	44,6%
Pénicillinase	15	26,8%
RNE	03	5,3%
H CASE	04	7,1%
BLSE	04	7,1%
Carb-R	06	10,7%
BMR	05	8,9%

RNE : Résistance Non Enzymatique ; **H CASE** : Hyperproduction de céphalosporinase ;

BLSE : Bêtalactamase à Spectre Elargie, **Carb-R** : Résistance aux carbapénèmes ;

BMR : Bactérie Multi-Résistante.

Le phénotype sauvage a été le plus exprimé avec 44,6% suivi du phénotype pénicillinase 26,8% par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans notre étude.

Un taux de 8,9% a été obtenu pour le phénotype BMR.

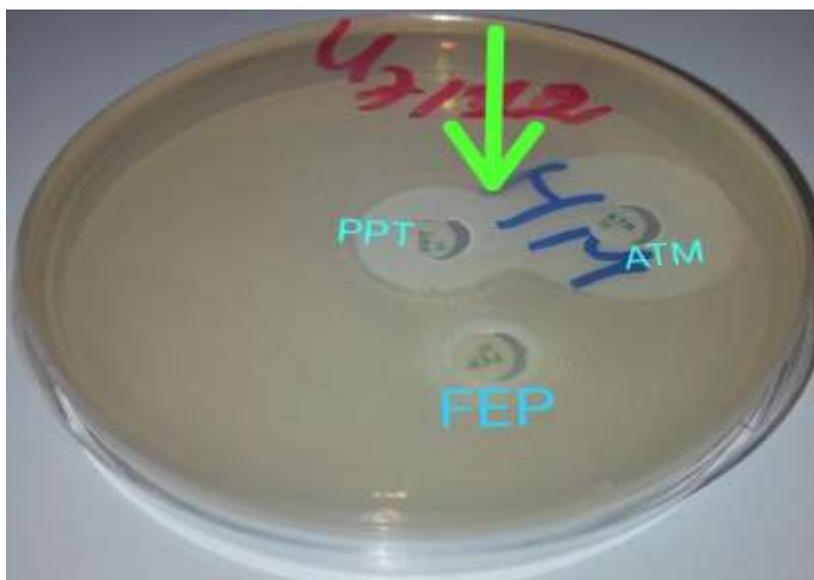


Figure 21 : Synergie (Bouchon de champagne) entre un disque de Pipéracilline+Tazobactam et un disque d’Aztréonam sur l’antibiogramme d’une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée au cours de notre étude : Souche productrice de BLSE.

Tableau XIV: Phénotypes de résistance aux aminosides des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées.

Phénotypes	Effectif	Pourcentage
AK ^S + CN ^S	41	73,2%
AK ^R + CN ^R	09	16,1%
CN ^R	06	10,7%

Le phénotype AK^S + CN^S a été le plus représenté avec 73,2% suivi du phénotype AK^R + CN^R avec 10,7% dans l’ensemble de nos souches.

6.2.2 Résistance aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii* :

Tableau XV : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées.

Antibiotiques	Résistants (n%)	Sensibles
BETA-LACTAMINES		
TIC	10(52,6%)	09(47,4%)
TCC	10(52,6%)	09(47,4%)
PIP	10(52,6%)	09(47,4%)
PTZ	09(47,4%)	10(52,6%)
CAZ	09(47,4%)	10(52,6%)
FEP	08(42,1%)	11(57,9%)
ATM	19(100%)	00(100%)
IPM	06(31,6%)	13(68,4%)
MEM	06(31,6%)	13(68,4%)
AMINOSIDES		
AK	04(21%)	15(79%)
CN	10(52%)	09(47,4%)
FLUOROQUINOLONES		
CIP	10(52,6%)	09(47,4%)
LVX	10(52,6%)	09(47,4%)
OFX	10(52,6%)	09(47,4%)
CYCLINES		
DO	12(63,1%)	07(36,9%)
TGC	05(26,3%)	14(73,7%)
AUTRES		
CS	00(00%)	19(100%)

Tout comme les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les souches d'*Acinetobacter baumannii* ont également présenté un niveau de résistance plus élevé aux pénicillines associées

ou non aux inhibiteurs. Ces niveaux de résistance étaient de 10(**52,6%**) à la Ticarcilline, 10(**52,6%**) à la Pipéracilline, 09(**47,4%**) à la Pipéracilline +Tazobactam.

Tableau XVI: Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées.

Phénotypes	Effectif	Pourcentage
Sauvage	09	47,3%
Pénicillinase	01	5,3%
H CASE	02	10,5%
BLSE	01	5,3%
Carbapénèmases	06	31,57%
BMR	06	31,57%

Les souches d'*A. baumannii* ont exprimé le plus le phénotype sauvage avec 47,3% suivi du phénotype Carbapénèmase avec 31,6% des souches d'*Acinetobacter baumannii* de notre étude. Toutes les souches exprimant le phénotype de carbapénèmase ont également exprimé la multirésistance aux antibiotiques.

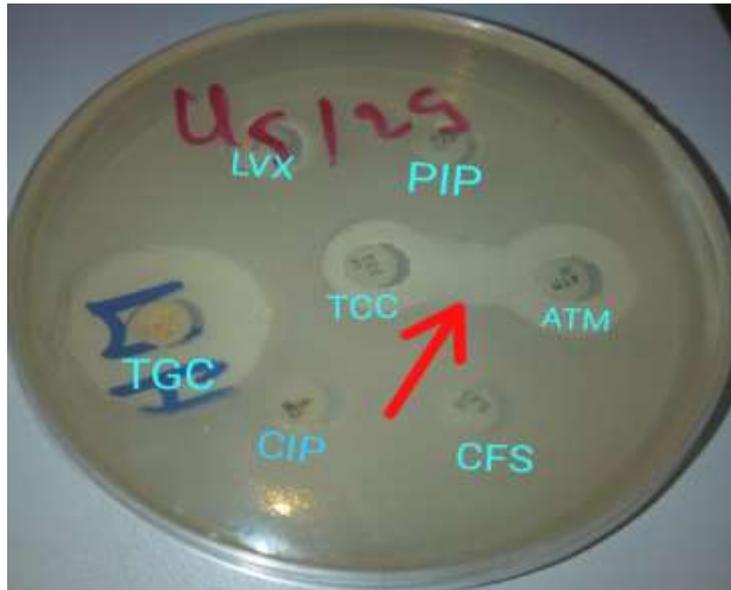


Figure 22 : Synergie (Bouchon de champagne) entre un disque de Ticarcilline +Acide clavulanique et un disque d’Aztréonam sur l’antibiogramme d’une souche d’*Acinetobacter baumannii* isolée au cours de notre étude : Souche productrice de BLSE.

Tableau XVII : Phénotypes de résistance aux aminosides des souches d’*Acinetobacter baumannii* isolées.

Phénotypes	Effectif	Pourcentage
AK ^S + CN ^S	11	57,8%
AK ^R + CN ^R	04	21,1%
CN ^R	04	21,1%

Le phénotype sauvage a été le plus représenté (57,8%) chez *A. baumannii*.

6.3 Résultats de la PCR pour la recherche des gènes de résistance aux carbapénèmes.

A partir des 75 souches isolées au total, 11 étaient résistantes aux carbapénèmes dont cinq (5) souches de *Pseudomonas aeruginosa* et six (6) d'*Acinetobacter baumannii*.

L'eau distillée a servi de témoin négatif et les souches du laboratoire déjà positives aux différents gènes de résistance aux carbapénèmes recherchés ont servi de témoins positifs appelés témoins _{maison}. Une amplification par PCR conventionnelle a été réalisée pour la recherche des gènes de résistance en utilisant des amorces spécifiques.

Après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% nous avons obtenu des bandes spécifiques correspondantes aux différents gènes en fonction de la taille des amplicons.

➤ ***Pseudomonas aeruginosa* :**

Les amorces utilisées dans cette étude nous ont permis de révéler :

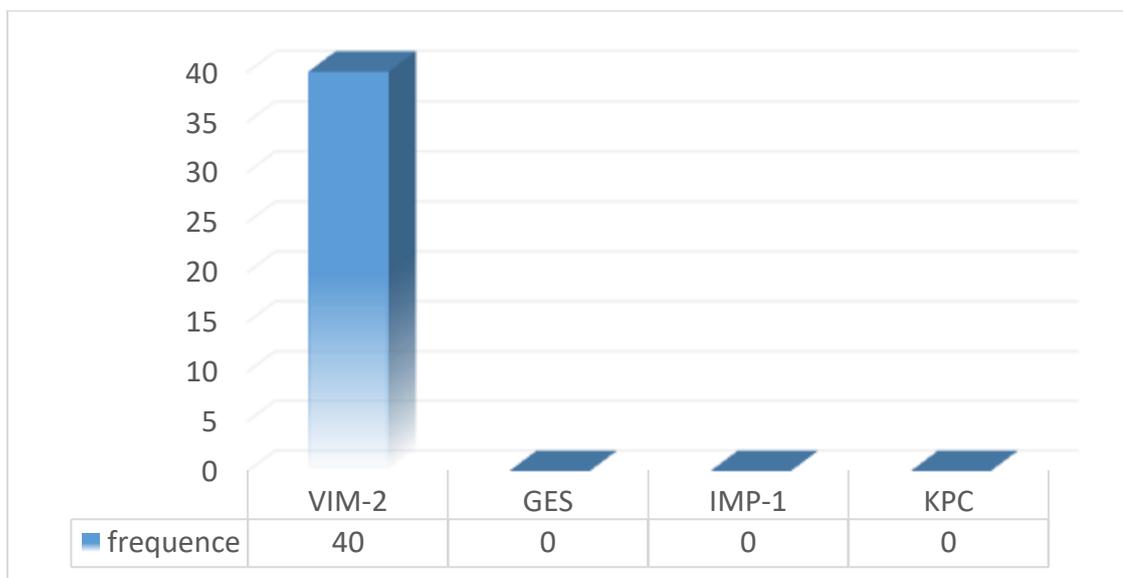


Figure 23 : Répartition des gènes de résistance aux carbapénèmes détectés chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, en fonction de leur fréquence.

Nous avons obtenu : 2(40%) de positivité pour VIM-2 et 0% pour les autres (GES, IMP-1 et KPC).

Tableau XVIII : Caractérisation des gènes de carbapénèmases détectés en fonction de l'origine des souches *Pseudomonas aeruginosa* et de la nature des échantillons.

Isolats	%Résistance carbapénèmes	Nature de l'échantillon	Gènes positifs détectés par PCR en Simplex
Hospitaliers	3,57(2/56)	EXPECTORATION	VIM-2 (1)
	3,57(2/56)	PUS	VIM-2 (1)
	1,78 (1/56)	URINE	-
Communautaires	00	-	-

VIM-2 : l'unique gène de résistance aux carbapénèmes révélé au cours de la PCR n'a été détecté que chez les souches de *P. aeruginosa* provenant des hôpitaux.

➤ *Acinetobacter baumannii* :

Parmi les souches d'*Acinetobacter baumannii* présentant une résistance aux carbapénèmes la PCR a révélé que le gène Bla_{Oxa-23} étaient présents dans 5/6 des souches soit 83,3%. Quant aux séquences d'insertions nous avons obtenu 100% de positivité de nos souches pour IsAba1, 0% pour IsAba4.

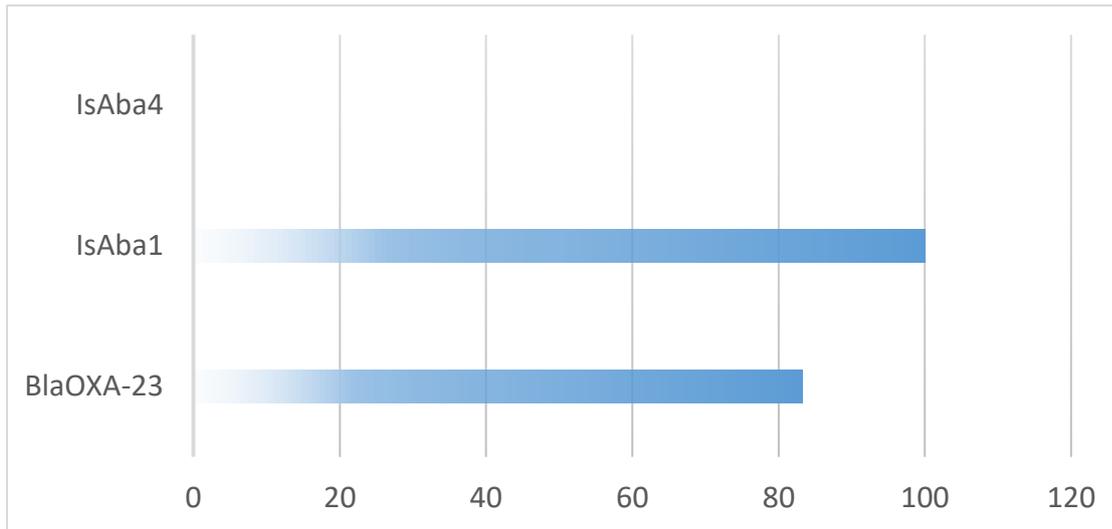
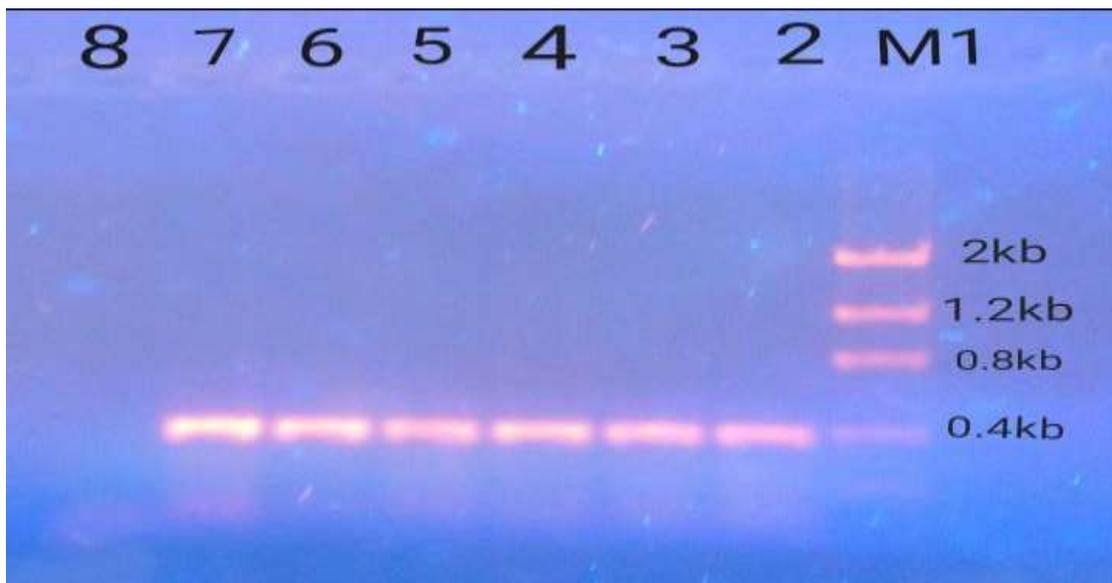
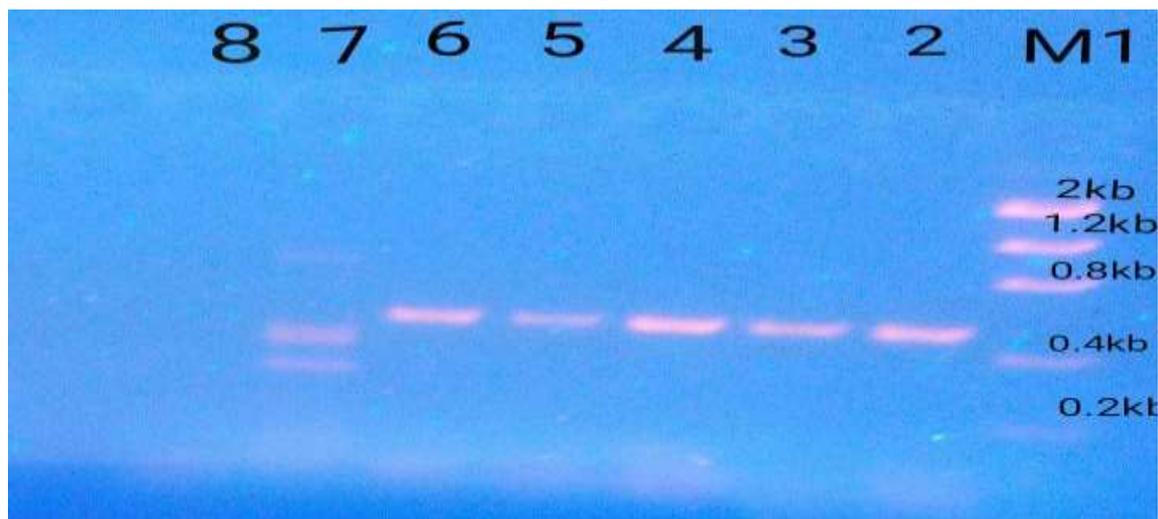


Figure 24 : Répartition des gènes de résistance aux carbapénèmes détectés chez *Acinetobacter baumannii* en fonction de leur fréquence.



Legende : **M 1** : Marqueur de poids moléculaire ; **3 à 7** : Echantillons ; **8** : Témoin négatif
2 : Témoin positif_{maison}

Figure 25 : Résultat de la PCR classique en simplex pour la recherche d'IsAba1 (taille du fragment : 389pb) des souches d' *Acinetobacter baumannii*.



Legende : **M 1** : Marqueur de poids moléculaire ; **3 à 7** : Echantillons ; **8** : Témoin négatif ; **2** : Témoin positif _{maison}.

Figure 26 : Résultat de la PCR classique en simplex pour la recherche du gène BlaOxa-23 (taille du fragment : 501pb) des souches d' *Acinetobacter baumannii*.

Tableau XIX: Caractérisation des gènes de carbapénémases détectés en fonction de l'origine des isolats d'*Acinetobacter baumannii* et de la nature des échantillons.

Isolats	%Résistance carbapénèmes	Nature de l'échantillon	Gènes positifs détectés par PCR en Simplex
Hospitaliers	26,31 (5/19)	Expectoration	Bla _{OXA-23} ; IsAba1
Communautaires	5,26 (1/19)	Expectoration	IsAba1

Les cinq souches résistantes aux carbapénèmes provenant des hôpitaux ont été toutes positives pour les gènes Bla_{OXA-23} et IsAba1.

7 Discussion

➤ Limites de ce travail :

Ce travail a été minutieusement élaboré cependant il présente quelques insuffisances.

- Le manque de certaines données des patients telles que : Une antibiothérapie en cours ; la durée de l'hospitalisation (patients hospitalisés) ; l'utilisation ou non des dispositifs médicaux invasifs ; les antécédents des patients (maladies chroniques). Ces informations pouvaient nous permettre de mieux comprendre la survenue des infections de ces bactéries chez Les patients.
- Nous n'avons pas pu réaliser le test de hodge pour la recherche de metallo-bêta-lactamases.

Cette étude prospective portant sur la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako a obtenu des résultats pertinents.

L'âge et le sexe :

La moyenne d'âge des patients infectés par *Pseudomonas aeruginosa* au cours de cette étude était de $42,24 \pm 23,50$ ans et le sexe masculin était majoritaire avec 55%. **Al Dawodeyah et al** (84) en Jordanie en 2018 ont rapporté un taux d'isolement de (57.4 %) chez le sexe masculin similaire au nôtre; et une moyenne d'âge 33.04 ± 11.89 ans inférieure au nôtre mais reste élevée et confirme du risque d'infection à *P. aeruginosa* chez les patients adultes.

La moyenne d'âge des patients infectés par *Acinetobacter baumannii* dans notre étude était $50,94 \pm 17,11$ ans, le sexe masculin a été le plus touché avec 63%. Ces taux sont superposables à ceux obtenus par **Shojaei et al** en 2016 en Iran soit une moyenne d'âge de $59,21 \pm 19,42$ et une prédominance masculine de 69% (86).

Cette prédominance masculine peut s'expliquer par le fait que l'infection due à ces deux espèces bactériennes est associée à certains facteurs de risques : le tabagisme, l'alcool ; mais elle ne fait pas la règle car certaines études ont montre une prédominance féminine (87).

➤ Provenance des souches

Dans la présente étude les souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* avaient prépondérément une origine hospitalière soit une fréquence respective de 82,14% et 94,74%.

Une étude réalisée en Europe en Bosnie-Herzégovine par **Rebic et al** en 2018 a rapporté également l'origine hospitalière des souches d'*Acinetobacter baumannii* soit 62,18% (88). *Acinetobacter baumannii* résiste à l'action de beaucoup d'antiseptiques et possède un pouvoir remarquable de colonisation de l'environnement hospitalier grâce à la formation de biofilms. Cela explique sa forte prévalence dans les infections nosocomiales et sa multiresistance aux antibiotiques.

Une étude iranienne menée par **Hashemi et al** (89) en 2017 a révélé qu'au contraire les souches de *Pseudomonas aeruginosa* avaient une prévalence élevée dans les échantillons des patients externes avec un taux d'isolement communautaire de 60,08%. Cela est inquiétant car cette bactérie possède d'énormes mécanismes de résistance aux antibiotiques.

➤ **Prévalence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* :**

Dans notre étude la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* 56/75 soit 75% était nettement supérieur à celle d'*A. baumannii* 19/75 soit 25%. Ce même constat a été fait par **Gildas et al** en 2013 à Rabbat (90) qui ont rapporté un taux d'isolement de 57(54, 3%) pour *P. aeruginosa* et de 48(45,7%) pour *A. baumannii*.

D'autres études montrent une fréquence plutôt élevée d'*Acinetobacter baumannii* telle que l'étude de **Pragasam et al** en Inde en 2016 qui a obtenu, 56,5% de fréquence d'isolement pour *A. baumannii* contre 43,5% pour *P. aeruginosa* (91).

➤ **Nature de l'échantillon :**

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements d'expectoration avec 50% suivi de prélèvement de pus 15/56 soit 26,8 et d'urine 13/56 soit 23,2%. Cette fréquence d'isolement des souches de *P. aeruginosa* dans les prélèvements bronchique dans notre étude est soutenue par **Pragasam et al** qui ont isolé respectivement 52,1% 15% et 2,9% de souches de *P. aeruginosa* dans les secretions respiratoires, dans le pus et l'urine (91).

Quant à *Acinetobacter baumannii*, elle a été plus isolée dans les prélèvements bronchiques (expectoration) 11/19 soit 57,9% et les prélèvements de pus et d'urine viennent en deuxième position avec 3/19 soit 15,8%. Ces taux diffèrent avec ceux de **Soukaina** au Maroc en 2017 (92) qui a obtenu 42.5% de souches dans les urines ; 20% dans le pus et enfin 12.5% dans les prélèvements bronchiques.

➤ **Résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* :**

Notre étude révèle une résistance assez élevée des souches de *P. aeruginosa* aux pénicillines. Nous avons obtenu 46,4% de résistance à la ticarcilline, 41,1% à la pipéracilline et 42,8% à la ticarcilline + acide clavulanique. Ces taux sont supérieurs à ceux obtenus par **Kamga et al** (93) au Cameroun en 2015 qui ont eu 35,5% de résistance à la ticarcilline 23,5% à la pipéracilline et 17,6% à la ticarcilline + acide clavulanique.

Nous avons également obtenu au cours de cette étude 34% de résistance à l'association pipéracilline + tazobactam ; 23,2% de résistance à la ceftazidime et au céfépime. L'étude de **Montalergre** (94) a rapporté un pourcentage de résistance à l'association pipéracilline/tazobactam, et à la ceftazidime supérieur aux nôtres avec respectivement 46,2% et 29,6% de résistance.

Les carbapénèmes avec 10,7 % de résistance à l'Imipénème et 8,9 % au Méropénème ont été les bêtalactamines les plus efficaces dans la présente étude. Ces taux avoisinent ceux observés par l'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) qui a retrouvé un taux de résistance de 9,6 % aux carbapénèmes en 2017 (Imipénème et Meropénème) en Europe. (95). Ces antibiotiques conservent mieux leur activité antityocyannique, mais des mesures de surveillance doivent être prises partout au monde pour limiter leur utilisation abusive et promouvoir leur usage approprié.

Les phénotypes de résistance les plus observés sur l'antibiogramme de nos souches ont été le phénotype sauvage avec un effectif de 25/56 soit 44,6% suivi du phénotype pénicillinase 15/56 soit 26,8%. Ce résultat est comparable avec celui obtenu par **Kamga et al** en 2015 (93) qui ont rapporté un taux de 61,8% et 26,5 % respectivement pour le phénotype sauvage et le phénotype pénicillinase.

Les taux suivants de résistance ont été observés 19,6%, 26,8% aux aminosides respectivement à l'Amikacine et à la Gentamicine, 21,4% à la Ciprofloxacine à la Levofloxacine, 30,3% de résistance à l'Ofloxacine et 00% de résistance à la colistine.

Par ailleurs en 2018 en Jordanie **Al Dawodeyah et al** (84) ont obtenu 50,8% et 62,3% de résistance aux aminosides respectivement à l'Amikacine et à la Gentamicine ; 50,9% de résistance à la Ciprofloxacine et une susceptibilité totale des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à la Colistine.

Nos pourcentages de résistance comparés avec ceux obtenus par l'étude de **Al Dawodeyah et al** sont inférieurs non seulement pour les aminosides mais aussi pour les fluoroquinolones. La colistine a été sensible à 100% dans les deux cas d'étude.

Le phénotype sauvage a été majoritairement présent dans notre étude chez les aminosides à hauteur de 73,2%. Ce même constat a été fait par **Kamga et al (93)** qui ont eu 94,1% de cas d'expression de phénotype sauvage.

Dans les hôpitaux on observe une circulation de plus en plus importante des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques. Dans notre étude 5/56 soit 8,9% de souches étaient multirésistantes. Ce taux est supérieur à celui de **Cholley et al (96)** qui ont obtenu 5,8% de souches BMR en 2010 ; mais peut atteindre jusqu'à 52.5% dans certaines études telle que celle de **Al Dawodeyah et al** en 2018 (84) isolées chez les patients hospitalisés atteints d'infections pneumonaires.

Parmi les quatre gènes pouvant conférer une résistance aux carbapénèmes recherchés dans cette étude nous avons obtenu 2(40%) de positivité pour VIM-2 et 0% pour les autres (GES-1, IMP-1 et KPC). **Al Dawodeyah et al** ont obtenu 3 (9,3%) de positivité pour VIM-2 ; 5 (15,6%) pour GES et 0% pour IMP-1 et pour KPC. Ces taux sont identiques aux nôtres pour IMP-1 et KPC ; et respectivement inférieur et supérieur pour VIM-2 et GES. En effet la métallo-bêtalactamase VIM-2 est la plus répandue à travers le monde(97).

Le mécanisme prédominant de la résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* reste l'association d'une imperméabilité (déficit en porine et/ou augmentation de l'efflux) à la production de céphalosporinase chromosomique(98). Ce qui peut expliquer la rareté de ces gènes impliqués dans la résistance aux carbapénèmes chez nos souches.

➤ **Résistance aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii*.**

Des taux élevés sont associés à la résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques dans notre étude. Elle fait état de 52,6 % de résistance à la ticarcilline, à la ticarcilline/acide clavulanique à la piperacilline et 47,4% de résistance pour la piperacilline+Tazobactam et la ceftazidime. Ce pourcentage élevé de résistance des souches d'*A. baumannii* à ces antibiotiques n'est pas étonnant car de nombreuses données de la littérature évoquent ce phénomène. L'étude de **Ebongue et al (99)** a montré des taux de résistance similaires avec 67,29% à la Ticarcilline ; 64,28 à la Ticarcilline+ acide clavulanique 68,33% à la piperacilline ; 56,97 % à la piperacilline /tazobactam et 58,27 % à la ceftazidime.

Nous avons obtenu un taux de résistance de 31,6% aux carbapénèmes (Imipénème et Méropénème) et 21% à l'Amikacine.

Une analyse des données recueillies entre 2011 et 2016 de la résistance chez *A. baumannii* des pays membres de l'OCDE (Organisation pour l'économie la coopération et le développement par **Xie et al** en 2018 montre un taux de résistance de l'ordre de **73,9%**, **70,1%**, 66,6% respectivement à l'Imipénème au Méropénème et à l'Amikacine (100).

L'efficacité des carbapénèmes est mise en cause face aux souches d'*A.baumannii* comme le témoignent ces études. Cela peut être due soit à la production d'enzymes de type Oxacillinases inactivatrices des carbapénèmes, à la production de métallobêta-lactamases ou à une perte/mutation de la porine.

Au cours de cette étude nous avons obtenu un taux de résistance de 52,6% à la Gentamicine ; à la Ciprofloxacine ainsi qu'aux autres fluoroquinolones testées (Levofloxacine et ofloxacine).

L'étude de **Soukaina** en 2017 a rapporté un taux de résistance de 77,5% à la Gentamicine et à la Ciprofloxacine. Ce taux est supérieur au nôtre et témoigne d'une diminution de l'activité de la Gentamicine et de la ciprofloxacine. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par la production d'enzymes inactivant les aminosides pour la gentamicine, des mutations dans la cible des quinolones que sont les topoisomérases (*gyrA*, *parC*) pour la ciprofloxacine et d'autre part la pression de sélection due à l'usage abusif de ces antibiotiques. La faible résistance à la tigécycline des souches de *A. baumannii* (**26,3%**) et la susceptibilité totale de cette bactérie à la colistine dans notre étude est confirmée par celle de **AL-Kadmy et al** (101) en 2017 qui sur 21 souches n'ont retrouvée aucune résistance à ces deux antibiotiques.

Selon **Livermore et Woodford**, (102) le nombre de souches d'*Acinetobacter* qui synthétisent les β -lactamases de type BLSE est faible. En effet, nos résultats vont dans ce même sens avec 1 souche sur 19 soit 5,26% de souches productrices de BLSE. Cependant cette bactérie possède une capacité remarquable à accumuler des mécanismes de résistance.

Dans notre étude **31,57%** des souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été multi-résistantes aux antibiotiques. Cette multirésistance est retrouvée également dans l'étude de **Soukaina** qui a rapporté un taux de 50% de multi-résistance des isolats d'*Acinetobacter baumannii* à l'hôpital militaire Moulay Ismail au Maroc en 2017.

Dans la présente étude 83,3 % des souches résistantes aux carbapénèmes possédaient le gène *bla_{Oxa-23}*. **Kobs et al** ont obtenu un taux de 91% d'isolats positifs au gène *bla_{Oxa-23}* au Brésil en 2016 (103).

La résistance aux carbapénèmes des souches d'*A. baumannii* concerne principalement les β -lactamases de la classe D-hydrolysant carbapénèmes (CHDL - classe d'Ambler D). Cette

résistance des souches d'*A. baumannii* aux carbapénèmes est principalement médiée par Bla_{OXA-23} . Cette dernière a été abondamment rapportée dans de nombreux pays du monde (104).

L'IsAba1 a été retrouvée chez la totalité (100%) de nos souches exprimant une résistance aux carbapénèmes et aucune positivité de nos souches n'a été observée à IsAba4.

Bahador et al ont obtenu respectivement pour les mêmes séquences d'insertion 61% et 7% de positivité (105).

ISAbal a été identifié en association avec plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques chez *A. baumannii*. Le rôle de IsAba1 dans l'expression du gène de résistance aux antibiotiques d'*A. baumannii* a été démontré pour bla_{ampC} , codant pour la céphalosporinase d'origine naturelle, et pour le gène bla_{OXA-23} , codant pour une oxacillinase -hydrolysant les carbapénèmes (106).

IsAba1 pourrait également être responsable de la mobilité de bla_{OXA-23} , avec deux copies encadrant ce gène de β -lactamase et formant un transposon composite (défini comme Tn2006)(107).

Nous n'avons pas cherché exactement la position d'IsAba1 par rapport à bla_{OXA-23} mais l'étude de **Kobs et al** a prouvé que 100% des isolats avec IsAba1 situés en amont du gène bla_{OXA-23} étaient résistants à l'imipénème et au méropénème au Brésil en 2010 et 85% en 2015.

8 Conclusion :

Pendant notre période d'étude nous avons isolé : 56 souches de *P. aeruginosa* et 19 souches d'*A. baumannii*. Le test de sensibilité aux antibiotiques montre que :

Les carbapénèmes (l'Imipénème et Meropénème) conservent mieux leur activité sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Par contre l'activité de cette classe de bêta-lactamines devient de plus en plus faible et controversée sur les souches d'*Acinetobacter baumannii*.

Pseudomonas aeruginosa et *Acinetobacter baumannii* deviennent de plus en plus multi-résistants aux antibiotiques. Ce constat est alarmant et explique l'inquiétude de l'OMS face à ce problème.

Les gènes de résistance aux carbapénèmes recherchés ont permis de mettre en évidence l'implication de VIM-2 dans la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa* au Mali et la présence quasi-totale du gène Bla_{OXA-23} et la séquence d'insertion IsAba1 chez les souches d'*Acinetobacter baumannii* résistants aux carbapénèmes. Une surveillance continue de la résistance de ces bactéries et des mesures de prévention sont essentielles pour prévenir et limiter la dissémination des supports de la résistance chez ces bactéries.

9 Recommandations :

Pour éviter la dissémination de ces gènes de résistance aux carbapénèmes et une diminution du taux de résistance aux antibiotiques quelques recommandations sont nécessaires :

➤ **Au ministère de la santé et des affaires sociales :**

- D'initier un programme national de surveillance et de lutte contre la résistance aux antibiotiques des espèces *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Assurer l'approvisionnement régulier de l'INRSP en réactifs consommables et équipements pour les analyses de routine et la recherche des supports de résistance aux antibiotiques,
- Prendre des dispositions pour réserver uniquement à l'usage hospitalier la prescription et la dispensation des carbapénèmes,

➤ **Aux cliniciens :**

- Prendre en compte les résultats des antibiogrammes dans la prescription des antibiotiques aux patients.

➤ **A la direction de l'INRSP :**

- Assurer la formation continue en personnel compétents en techniques de biologie moléculaire,

➤ **Aux chercheurs de l'INRSP,**

- Mettre en place un système de surveillance et d'étude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries potentiellement multirésistantes,

➤ **A l'industrie pharmaceutique**

- Promouvoir la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques contre les germes multi-résistants.

10 Références

1. Kunitz CM. Resistance to antimicrobial drugs—a worldwide calamity. *Annals of internal medicine*. 1993;118(7):557-61.
2. Ouedraogo A, Pierre HJ, Banuls A-L, Ouédraogo R, Godreuil S. Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest: facteurs favorisants et évaluation de la menace. *Médecine et Santé Tropicales*. 2017;27(2):147-54.
3. Organisation mondiale de la Santé O. L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. communiqué, févr. 2017.
4. C M. Bacilles à Gram négatif non fermentaires. *Bactériologie Médicale Techniques usuelles* Masson 2016.:332-4.
5. François D, Marie-Cécile P, Christian M, Edouard B, Roland Q. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Masson P. 2007;333.
6. Khalilzadeh P. Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing: Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2009.
7. Zinafi N, Hafallah O, Yanat BE. Etude de l'activité antibiofilm d'extraits bruts de souches d'actinobactéries vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. 2018.
8. Pier G, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania, USA; 2005.
9. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008;7(5):450-3.
10. Kerem E, Corey M, Kerem B-s, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis—analysis of the most common mutation ($\Delta F508$). *New England Journal of Medicine*. 1990;323(22):1517-22.
11. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003;361(9358):681-9.
12. Registre français de la mucoviscidose :bilan des données 2007.
13. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):654.
14. Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M, editors. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annales de biologie clinique*; 2011.

15. Bellifa S. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen.
16. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current opinion in microbiology*. 2003;6(1):56-60.
17. Mattmann ME, Geske GD, Worzalla GA, Chandler JR, Sappington KJ, Greenberg EP, et al. Synthetic ligands that activate and inhibit a quorum-sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(10):3072-5.
18. Calfee MW, Coleman JP, Pesci EC. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2001;98(20):11633-7.
19. Brisou J, Prevot A, editors. *Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group*. Annales de l'Institut Pasteur; 1954.
20. Baumann P, Doudoroff M, Stanier R. A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of bacteriology*. 1968;95(5):1520-41.
21. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1986;36(2):228-40.
22. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
23. Chan JZ, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC microbiology*. 2012;12(1):302.
24. Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66(10):4105-11.
25. Fechkeur Y, Thibault M. *Acinetobacter*: aspect bactériologique, habitat, pouvoir pathogène et sensibilité aux antibiotiques. *Feuillets de biologie*. 1998;39(222):39-45.
26. Siegrist H. *Acinetobacter spp.* Infections nosocomiales, épidémiologie et résistances aux antibiotiques. *Swiss NOSO*. 2000;7:1.

27. Kishii K, Kikuchi K, Matsuda N, Yoshida A, Okuzumi K, Uetera Y, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(5):424-30.
28. Garrouste-Orgeas M, Marie O, Rouveau M, Villiers S, Arlet G, Schlemmer B. Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: relationship with nosocomial infections and mortality. *Journal of Hospital Infection.* 1996;34(4):279-89.
29. Weinstein RA, Gaynes R, Edwards JR, System NNIS. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases.* 2005;41(6):848-54.
30. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Critical care.* 2007;11(3):134.
31. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, et al. First report of bla_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *International Journal of Infectious Diseases.* 2014;21:21-3.
32. Falagas ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *International journal of antimicrobial agents.* 2015;45(5):455-60.
33. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: an overview. *Microbes and environments.* 2011;26(2):101-12.
34. Basri R, Zueter AR, Mohamed Z, Alam MK, NORSA'ADAH B, Hasan SA, et al. Burden of bacterial meningitis: a retrospective review on laboratory parameters and factors associated with death in meningitis, Kelantan Malaysia. *Nagoya journal of medical science.* 2015;77(1-2):59.
35. Jung J, Park W. *Acinetobacter species* as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology.* 2015;99(6):2533-48.
36. Almasaudi SB. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences.* 2018;25(3):586-96.
37. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin J-H, et al. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS microbiology letters.* 2009;301(2):224-31.

38. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and immunity*. 2009;77(8):3150-60.
39. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, et al. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infection and immunity*. 2010;78(5):2017-23.
40. Weber BS, Harding CM, Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *Journal of bacteriology*. 2016;198(6):880-7.
41. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(2):130-55.
42. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010;74(1):81-94.
43. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of the carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;AAC. 00929-10.
44. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One*. 2011;6(8):e22674.
45. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun*. 2012;80(3):1015-24.
46. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of bacteriology*. 2008;190(3):1036-44.
47. Roca Subirà I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila Estapé J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:148.
48. Avril J, Tardivel R. Bacterial complications of blood transfusions. *Transfusion clinique et biologique: journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 1996;3(1):43.
49. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004;61(17):2200-23.

50. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(2):479-87.
51. Dougherty TJ, Beaulieu D, Barrett JF. New quinolones and the impact on resistance. Drug discovery today. 2001;6(10):529-36.
52. EL BOUDERKAOUI MM. Bactériémies en réanimation: Epidémiologie, traitement et évolution: UNIVERSITE CADI AYYAD; 1988.
53. Ploy M-C, Lambert T, Gassama A, Denis F, editors. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Annales de Biologie Clinique; 2000.
54. Lemée L. Quels critères microbiologiques pour définir une colonisation ou une infection à *Staphylococcus aureus* et à *Pseudomonas aeruginosa*? Revue des maladies respiratoires. 2003;20(2):3S69-3S78.
55. Skurnik D, Andremont A. Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. Réanimation. 2006;15(3):198-204.
56. Ojha S, Kostrzynska M. Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. Veterinary Research. 2008;39(1):1-22.
57. Philippon A, Arlet G, editors. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! Annales de biologie clinique; 2006.
58. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Høiby N. Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(11):3406-11.
59. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(6):1211.
60. Vora S, Auckenthaler R. [What is the significance of extended spectrum betalactamases in clinical practice?]. Rev Med Suisse. 2009;5(220):1991-4.
61. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1998;42(2):128-31.
62. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr Opin Infect Dis. 2008;21(4):367-71.
63. Pechere J, Michea-Hamzhepour M, Köhler T. Antibiotic efflux, a mechanism of multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Bulletin de l'Academie nationale de medecine. 1998;182(3):599-612; discussion 3-5.

64. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(5):1281-4.
65. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(3):373-83.
66. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical infectious diseases*. 2002;34(5):634-40.
67. Pechère JC, Köhler T. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical microbiology and infection*. 1999;5:S15-S8.
68. Kettner M, Kallová J, Hletkova M, Milošovič P. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. *Infection*. 1995;23(6):380-3.
69. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, Lin BB, Lockwood LG, Dirks JE, et al. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(3):1180-4.
70. Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34(6):1273-5.
71. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(8):2263-8.
72. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(11):4783-8.
73. Sinha M, Srinivasa H, Macaden R. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter species*. *Indian journal of medical research*. 2007;126(1):63.
74. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar J-R, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(1):349-54.

75. Shakil S, Khan A. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. *Journal of Chemotherapy*. 2010;22(5):324-7.
76. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(5):381-93.
77. Rolain J, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical microbiology and infection*. 2010;16(12):1699-701.
78. H eritier C, Poirel L, Fournier P-E, Claverie J-M, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(10):4174-9.
79. Fatoumata T. Résistance aux bêta-lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A. LE DANTEC: Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P: 29-40; 2004.
80. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Z rawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2008;46(3):257-67.
81. Bergogne-B rezin E, Dellamonica P. Antibioth rapie en pratique clinique: (DEPRECIATED); 1999.
82. Bergogne-Berezin E. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 1997;6(2):119-27.
83. Jiang X, Yu T, Jiang X, Zhang W, Zhang L, Ma J. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Henan, China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014;79(3):381-3.
84. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*. 2018;8(1):31.
85. Figueiredo S. *Acinetobacter spp.* et r servoir de gènes de carbap n mases: Paris 11; 2011.
86. Shojaei L, Mohammadi M, Beigmohammadi M-T, Doomanlou M, Abdollahi A, Feizabadi MM, et al. Clinical response and outcome of pneumonia due to multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients. *Iranian journal of microbiology*. 2016;8(5):288.

87. García-Garmendia J-L, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez F-J, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE, et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical infectious diseases*. 2001;33(7):939-46.
88. Rebic V, Masic N, Teskeredzic S, Aljicevic M, Abduzaimovic A, Rebic D. The Importance of *Acinetobacter Species* in the Hospital Environment. *Medical Archives*. 2018;72(5):325.
89. Hashemi NS, Mojiri M, Kachouyi PY, Eskandari S, Mohammadian M, Alavi I. Prevalence of antibiotic resistance and blaIMP-1 gene among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn and urinary tract infections in Isfahan, central Iran. *Microbiology Research*. 2017;8(2).
90. Gildas Comlan Zohoun A, Mocket D, El Hamzaoui S. [Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to imipenem by production of metallo-beta-lactamases in Rabat Military Teaching Hospital Mohammed V]. *Ann Biol Clin*. 2013;71(1):27-30.
91. Pragasam A, Vijayakumar S, Bakthavatchalam Y, Kapil A, Das B, Ray P, et al. Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. *Indian journal of medical microbiology*. 2016;34(4):433.
92. Soukaina W. epidemiologie et resistance aux antibiotiques des isolats cliniques d'*Acinetobacter baumannii* à l'hôpital Militaire Moulay Ismail - Meknès [thèse médecine]2017.
93. Kamga HG. Caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la ville de Yaoundé (Cameroun). *African Journal of Pathology and Microbiology*. 2015(1).
94. Montalegre R. Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques antityocyaniques en réanimation: éditeur inconnu; 2016.
95. ; Available from: <http://www.nosoinfo.be/nosoinfos/principaux-resultats-du-rapport-ears-net-2017/>.
96. Cholley P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Thouverez M, Plésiat P, Hocquet D, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Journal of Hospital Infection*. 2010;76(4):316-9.

97. Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *Journal of Hospital Infection*. 2008;68(1):73-82.
98. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. Expert opinion on pharmacotherapy. 2008;9(1):23-37.
99. Ebongue CO, Mengue ER, Mefo'o J-PN, Tsiazok MD, Kouassi RNg, Bum EN. Antimicrobial Multi-Resistance of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Clinical Specimens in Douala (Cameroon). *Journal of Diseases and Medicinal Plants*. 2015;1(2):31-6.
100. Xie R, Zhang XD, Zhao Q, Peng B, Zheng J. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerging microbes & infections*. 2018;7(1):1-10.
101. AL-Kadmy IM, Ali ANM, Salman IMA, Khazaal SS. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. *New microbes and new infections*. 2018;21:51-7.
102. Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in microbiology*. 2006;14(9):413-20.
103. Kobs VC, Ferreira JA, Bobrowicz TA, Ferreira LE, Deglmann RC, Westphal GA, et al. The role of the genetic elements bla oxa and IS Aba 1 in the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016;49(4):433-40.
104. Mathlouthi N, Al-Bayssari C, Bakour S, Rolain JM, Chouchani C. RETRACTED ARTICLE: Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017;43(1):43-61.
105. Office FP. Erratum: Genotypic and Antimicrobial Susceptibility of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Analysis of IS Aba Elements and bla OXA-23-like Genes Including a New Variant. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1430.
106. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection*. 2006;12(2):123-30.
107. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1530-3.

Annexes

Procédures normalisés d'analyse des échantillons :

A. Expectoration :

1. Objectifs

- Identifier la bactérie ou les bactéries en cause
- Différencier les bactéries commensales des pathogènes
- Étudier la sensibilité aux agents antimicrobiens.
- Participer au suivi thérapeutique

2. Technique

L'examen macroscopique :

- Apprécier l'aspect de l'expectoration : expectoration salivaire, muqueuse, purulente, muco-purulente....

L'examen microscopique :

La technique décrite par Bartlett et adaptée par Murray et Washington, permet d'apprécier le degré de contamination par la salive.

- Examiner soit à l'état frais, ou soit un frottis coloré par la méthode de Gram au microscope à grossissement x 100
- Dénombrer en faisant une moyenne sur 10 champs les cellules épithéliales et les leucocytes par champ.
- Les résultats de l'examen microscopique permettent de distinguer 5 classes de crachats

Classe	cellules par champ	
	Epithéliales	leucocytes
1	> 25	<10
2	> 25	10-25
3	> 25	> 25
4	10-25	> 25
5	<10	> 25

- Les crachats de classe 1 et 2 sont fortement contaminés par la salive. Ils ne sont pas utilisables pour la culture.
- Demander un autre prélèvement
- Les crachats de classe 3, 4 ont un nombre de leucocytes qui témoigne d'une réaction inflammatoire mais sont contaminés par la salive.
- Les crachats de classe 5 sont les plus appropriés pour l'examen bactériologique.
- Ceux de classe 4 sont acceptable

3. Culture

Le choix des milieux de culture est fait en fonction du Gram lu

- Gélose chocolat poly vitex sous CO₂ à 37°C
- Gélose au sang sous CO₂ à 37°C
- Chapman pour les Cocci en amas
- Gélose drigalski pour les bacilles à Gram négatif

B. Examen cyto bactériologique des urines :(ECBU)

Objectifs :

Identifier la bactérie responsable ; déterminer sa sensibilité aux antibiotiques pour guider le médecin.

Confirmer le succès du traitement(contrôle)

Technique

Examen macroscopique :

- Apprécier l'aspect (couleur, turbidité ...) de l'urine à l'œil nu.
- Centrifuger les urines à 1500 tours pendant 5 minutes et le culot
-
- Apprécier le culot de centrifugation (minime, peu abondant, abondant...) et examinées entre lame et lamelle au microscope.

Examen microscopique :

- Rechercher à l'objectif x40 la présence de leucocytes qui témoignent d'une infection bactérienne et signaler la présence d'hématies de cristaux de cylindres de parasites.

NB : cet examen est à faire dans les 2heures qui suivent le prélèvement afin de limiter l'altération des éléments cellulaires.

Examen après coloration de Gram :

Faire un frottis du culot de centrifugation sur la lame puis colorer au Gram

Observer à l'objectif x100 à immersion la présence de polynucléaires / champ et des cellules épithéliales malpighiens.

a. Mise en culture

Ensemencer en fonction des résultats de la coloration de Gram : gélose trypticase pour les B⁻ ou des Cocci à Gram positif en amas et la gélose au sang pour les Cocci Gram positif en chaînette.

b. Interprétation des résultats

- L'urine normale contient moins de 5leucocytes /champ (objectifx40) et pas de germes
- Si la leucocyturie est >5/champ (10^4 leucocytes/ml) avec présence de nombreuses cellules bactérienne il s'agit d'une infection urinaire.
- Si la leucocyturie est >5/champ et sans germes il s'agit d'une infection traitée, décapitée ou due à d'autres bactéries (BK Chlamydia ou Mycoplasme)
- Si la leucocyturie est < 5/champ sans germe il ne s'agit pas d'infection bactérienne
- Si le prélèvement contient de nombreuses cellules vaginales (prélèvement féminin) accompagnées ou non d'un mélange de bactéries, il s'agit d'un prélèvement contaminé quel que soit le nombre de bactéries observées par champ. Refaire l'ECBU et insister sur le mode de recueil des urines.

C. EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIE DU PUS (ECB du Pus)

1) Principe

Il s'agit d'identifier des germes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieu de culture spécifique aux germes recherchés.

2) Examen direct

- Faire un étalement du pus sur une lame et laisser sécher
- Colorer la lame au Gram
- Observer à l'objectif x 100 à immersion la présence de germes des polynucléaires, des spores de levures ...

3) Culture :

Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu :

- Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO₂,
- Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO₂,
- Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,
- Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
- Chapman, incubé en aérobiose,
- Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
- Bouillon cœur-cervelle.
- Porter le tout à l'étuve pendant 24 heures.

NB : si les germes ne poussent pas sur les différents milieux de culture citées ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

D. Identification des germes :

- Pour les bacilles Gram négatif ensemencer le kligler –hajna et API 20^E
- Pour les Cocci à Gram positif en amas, faire la catalase, coagulase ou l'agglutination avec les antisérums
- Pour les Cocci à Gram positif en chaînette, faire la catalase et le sero-groupage.

Fiche technique galeries API 20^E

I. Principe

Le système API Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différents alvéoles qui composent la micro galerie (contenant des substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleurs spontanées ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries. Elle comprend 20 tests biochimiques.

II. Mode opératoire :

a. Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation

b. Préparation de l'inoculum

- Ouvrir un tube contenant de l'eau physiologique stérile
- Prélever une seule colonie bien isolée sur un milieu gélosé
- Réaliser une suspension bactérienne faible (densité égale à 0,5 Mc Farland)

c. Inoculation de la galerie

- Remplir les tubules et les cupules des tests soulignés et encadrés
- Remplir les tubules des tests soulignés et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose.
- Remplir uniquement les tubules des tests restants.

Remarque :

Il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après l'incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (Gaz+).

Résultat :

- Noter sur la fiche de résultat toutes les réactions spontanées.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test VP, TDA, IND, Nitrate réductase.

Identification :

- Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité.
- Avec le catalogue analytique : les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.
On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification
- Avec un logiciel d'identification lire le code obtenu.

PROCEDURE DE L'ANTIBIOGRAMME

Pour les bactéries à non exigeantes (Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp, Acinetobacter spp, Staphylocoque spp, Enterococcus spp)

A. Indications

- Guider le clinicien dans le choix de l'antibiotique approprié au traitement d'une infection bactérienne.
- Fournir des données épidémiologiques sur la résistance des germes importants en santé publique.

B. Mode opératoire

1) Milieu

- Gélose Mueller Hinton

2) Préparation de l'inoculum bactérien.

- Prélever 3 à 5 colonies d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu non sélectif
- Transvaser dans 5ml d'eau physiologique à 0,9%
- Homogénéiser au vortex
- Comparer la suspension ainsi obtenue à l'étalon de turbidité 0,5 Mc Farland
- Ajuster si nécessaire la densité de la suspension en y ajoutant soit des bactéries soit de l'eau physiologique.
- Diluer au 1/100 (bacilles à Gram négatif) ou 1/10 (Staphylococcus aureus et pour l'oxacilline) la suspension dans l'eau physiologique stérile 0,9%.

3) Ensemencement

Régénérer le milieu MH à la température du laboratoire ou à l'étuve pendant 30 minutes avant l'ensemencement.

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ;
- Eliminer l'excès d'inoculum en pressant l'écouvillon et en le faisant rouler contre les parois du tube ;
- Ensemencer en stries sur toute la surface du milieu à trois reprises en faisant tourner à chaque fois la boîte après chaque application ;
- Passer ensuite l'écouvillon sur bord de la gélose.

4) Distribution des disques d'antibiotiques

- Déposer les disques (7 disques/boîte de 90 à 10 cm de Φ) à l'aide du distributeur ou d'une paire de pinces stérile.
- Les disques doivent parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose.
- Une distance minimale de 15cm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au minimum 30mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas (6 disques périphériques et 1 disque du milieu de la boîte).

5) Incubation :

- Mettre les boîtes à l'étuve à 35-37°C avec le couvercle en bas,
- Ne pas empiler plus de deux boîtes les unes sur les autres dans l'étuve.

6) Lecture

- Mesure en mm le diamètre d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle plate ou d'un pied de coulisse.
- Ces mesures doivent être effectués sur la face inférieure de la boîte sans ouvrir le couvercle.
- Comparer les diamètres obtenus aux diamètres critiques de l'abaque (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et interpréter le résultat en sensible intermédiaire ou résistant.

FICHE SIGNALYTIQUE

Nom : DEMBELE

Adresse E-mail : drdensed@yahoo.com

Prénom : Seth

Année universitaire :2018-2019

Pays : Mali

Titre de thèse : Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako.

Abstract :

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont des bactéries nosocomiales. Elles sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques et la survenue de résistance aux molécules reconnues actives est à l'origine de l'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques. Cette étude a été entreprise pour évaluer le niveau de résistance des isolats en routine de ces bactéries au Mali et de déterminer les supports de la résistance de ces bactéries aux carbapénèmes.

Méthodologie : les souches ont été isolées à partir de divers échantillons, l'identification a été faite à la galerie API 20E et confirmée par le Vitek2 bio-Mérieux. L'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de Kirby bauer, interprété selon les recommandations du CASFM 2018. La PCR classique a été réalisée sur les souches résistantes aux carbapénèmes pour la recherche des gènes de résistance.

Résultats : Nous avons isolés pendant 13mois, 56 souches de *P. aeruginosa* et 19 souches d'*A. baumannii*. 82,14% des souches de *P. aeruginosa* et 94,74% des souches d'*A. baumannii* provenaient des hôpitaux. Les souches de *P. aeruginosa* ont présenté une résistance de 10,7% à l'IPM, 46,4% à la TIC ; 26,8 à la CN, 21, 4% à la CIP et 0% à la CS. Celles d'*Acinetobacter baumannii* ont présenté une résistance de 31,57% à l'IPM, 52,6% à la TIC, à la CN et à la CIP, 0% à la CS. Nous avons obtenu à la PCR classique chez les souches de *P. aeruginosa* carb-R un taux de 40% à VIM-2 ; 0% à GES, KPC et IMP-1 et chez les souches d'*A. baumannii* carb-R un taux de 83,3% à Bla_{OXA-23}, 100% à IsAba1 et 0% à IsAba4.

Conclusion : la résistance chez ces bactéries restent un phénomène inquiétant au Mali.

Mots clés : *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, Résistance, Antibiotiques, PCR classique.

SERMENT DE GALIEN :

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure.