

## INTRODUCTION.

Les bacilles à Gram négatif, hôtes naturels de l'intestin et de l'environnement, sont responsables d'infections multiples (5).

Les bacilles à Gram négatif ont manifesté vis à vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui a abouti à des problèmes thérapeutiques encore aigus.

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif responsables d'infections humaines graves (2).

L'émergence au sein des entérobactéries, d'une résistance aux bêtalactamines par le biais d'une sécrétion de bêtalactamases n'est pas un phénomène nouveau, mais certaines caractéristiques des nouvelles enzymes confèrent aux germes une résistance à l'encontre de la plupart des bêtalactamines, y compris des molécules récemment commercialisées, voire à l'encontre d'antibiotique d'autres familles comme les aminosides et les fluoroquinolones.

Ainsi, aujourd'hui la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches des espèces isolées à Dakar est une activité permanente et fondamentale ; La pathologie infectieuse y reste en effet extrêmement fréquente et l'antibiothérapie constitue l'essentielle de la thérapeutique en médecine curative et parfois préventive (4).

Il existe peu d'informations sur la sensibilité antimicrobienne et en particulier sur les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de plusieurs antibiotiques vis à vis d'isolats bactériens et pour la pratique d'un contrôle des infections prévalentes au sein de l'hôpital et de la communauté.

Les objectifs de notre étude sont :

- d'obtenir des données de sensibilité microbienne in vitro sur des pathogènes telles *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Enterobacter* provenant de spécimen divers.
- de suivre principalement la sensibilité des souches multirésistantes aux nouvelles molécules surtout les CSP4 (cefepime).
- La méthode du E-test a été utilisé pour la détermination des CMI et l'analyse des résultats a été effectué avec le logiciel Whonet 4.

# I- GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES

## 1-1- Définition.

Les antibiotiques sont des substances chimiques ou hémisynthétiques élaborées par des micro-organismes et qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des bactéries en les détruisant ou en inhibant leur multiplication .

## 1-2- Classification (26, 41, 63).

### 1-2-1- $\beta$ -lactamines

Cette famille, dont le représentant le plus ancien est la pénicilline G, comprend plus de cinquante produits utilisés en thérapeutique, la plupart étant obtenus par héli-synthèse. La structure du noyau de base, comportant toujours le cycle  $\beta$ -lactame permet de répartir ces produits en trois groupes :

+ Premier groupe

$\mu$  Formule générale

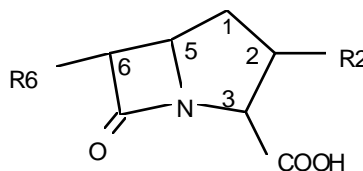


Figure 1 : Formule générale du 1<sup>er</sup> groupe.

#### $\mu$ Les pénams

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

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

quelques pénicillines orales (pénicilline V, phénéticilline, propicilline, clométhicilline)

\* Les pénicillines anti-staphylococciques, résistantes à la pénicillinase du staphylocoque : méthicilline et isoxazolyl - pénicillines (oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline).

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

Les aminopénicillines (ampicilline, amoxycilline, épécilline) ne sont jamais actives sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Par contre les carboxypénicillines (carbénicilline et ticarcilline) et l'apalcilline peuvent être actives sur ce germe.

- Les amidinopénicillines (amidinocilline ou mecillinam et pivmécillinam) ne sont actives que sur les bacilles à Gram négatif.

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

#### $\mu$ Les Pénems

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

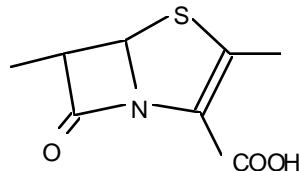


Figure 2 : Formule des pénems.

#### $\mu$ Les carbapénems

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

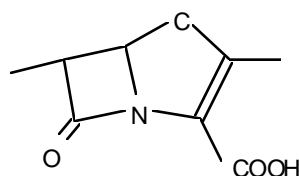


Figure 3 : Formule des carbapénems.

μ Les oxapénams ou clavams

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

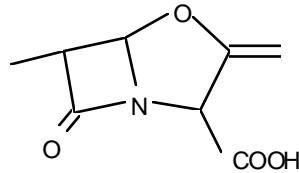


Figure 4 : Formule des oxapénams.

+ Deuxième groupe

μ Formule générale

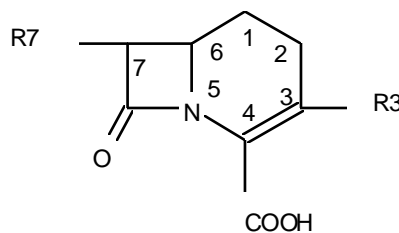


Figure 5 : Formule générale du 2<sup>ème</sup> groupe.

μ Les céphems.

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

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

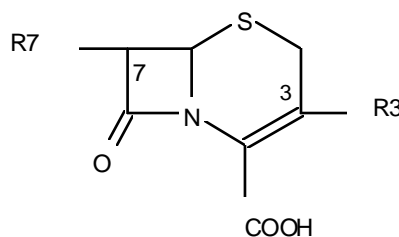


Figure 6 : Formule des céphems.

### μ Les oxacéphems.

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

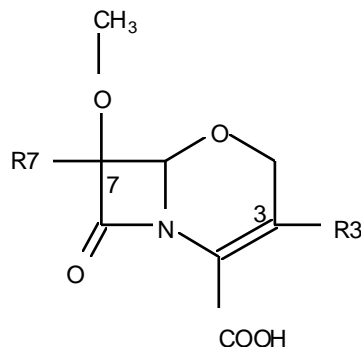


Figure 7 : Formule des oxacéphems.

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

Ce sont tous des produits à large spectre, mais dont l'intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif.

De ce point de vue, les trois générations se distinguent par leur niveau d'activité intrinsèque et leur résistance à l'inactivation par les Bétalactamases.

#### μ Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération

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

Les principaux produits sont les suivants : céfalotine, céfacétrile, céfapirine, céfaloridine, céfazoline inactifs par voie buccale; céfradine, céfalexine, céfadroxil, céfaclor, céfatrizine, actifs par voie buccale.

#### μ Les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération.

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

μ Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

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

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

μ Les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération.

Noyau de base

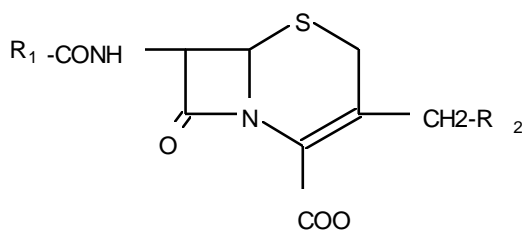


Figure 8 : Formule des céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération.

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

Elles comprennent au moins une demi-douzaine de produits incluant cefpirome, céfépime, Cefclidine, cefozoprane.

+ Troisième groupe

μ Formule générale

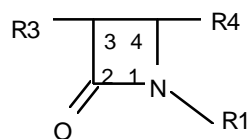


Figure 9 : Formule générale du 3<sup>ème</sup> groupe.

Il correspond aux monobactams. Un produit est actuellement utilisé, l'azthréonam. Son spectre est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies. Son activité s'étend à *Pseudomonas aeruginosa*

### 1-2-2- Les aminosides

Les aminosides ou aminoglycosides ou oligosaccharides ou streptomycinoïdes, plus correctement dénommés aminosides-aminocyclitols (AMAC) sont constitués par un ou plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol. Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides à large spectre.

Les AMAC se divisent en deux grands groupes :

- 1 La streptomycine et ses dérivés dont les sucres sont liés à un cycle streptidine.
- 1 Les autres aminosides qui ont en commun le cycle désoxystreptamine. Selon la position des sucres fixés sur ce cycle, on distingue deux sous-groupes :
  - Substitution en 4-5 : néomycine, paramomycine, lividomycine, ribostamycine et butyrosine.
  - Substitution en 4-6 : kanamycine, tobramycine, dibékacine et amikacine d'une part, gentamicine, sisomycine et nétilmicine d'autre part.

### 1-2-3- Macrolides, lincosamides, Streptogramines : (MLS).

Les MLS ont un spectre limité comprenant les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif, les mycoplasmes et les bacilles à Gram négatif anaérobies.

μ Les macrolides :

Erythromycine, oléandomycine, spiramycine, josamycine, midécamycine, roxithromycine.

μ Les Lincosamides :

Lincomycine, clindamycine.

μ Les Streptogramines ou synergistines

Pristinamycine, et virginiamycine.

### **1-2-4- Les Cyclines**

Les principaux produits sont : la tétracycline, l'oxytétracycline, la déméthylchlorotétracycline, la rolitétracycline, la métacycline, la doxycycline et la minocycline.

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre, seulement bactériostatiques. Leur activité s'étend aux rickettsies, chlamydiales et mycoplasmes.

### **1-2-5- Les Phénicoles.**

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre dérivés de l'acide dichlor-acétique, nous distinguons : le Chloremphénicole et le Thiempenicole

### **1-2-6- les Quinolones**

On peut les diviser en deux groupes :

1 Les produits les plus anciens ne sont pratiquement actifs que sur les bacilles à Gram négatif, principalement les entérobactéries, et ne sont indiqués que dans le traitement des infections urinaires. Ils comprennent l'acide nalidixique, produit le plus ancien; l'acide piromidique et la cinoxacin d'activité comparable; l'acide oxolinique; l'acide pipémidique et la fluméquine plus actifs in vitro.

1 Les produits les plus récents sont particulièrement intéressants par leur activité plus grande, par leur spectre plus large et par leur pharmacocinétique. A côté des produits en cours d'étude, ceux actuellement utilisés sont : la péfloxacin, l'énoxacin, l'ofloxacin, la ciprofloxacine, la norfloxacine.

### **1-2-7- Les 5-nitro-imidazolés**

Leur spectre particulier est limité aux bactéries anaérobies. Quatre produits, d'activité comparable, sont utilisés : le métronidazole, l'ornidazole, le secnidazole et le timidazole.



### **1-2-8- Les Nitrofuranes**

Leur spectre est large et en raison de leur pharmacocinétique, ils ne sont utilisés que pour traiter des infections urinaires ou intestinales.

### **1-2-9- Les Sulfamides**

Ce sont les plus anciens des agents antibactériens d'usage thérapeutique (DOMAGK, 1935). Les produits disponibles sont en nombre limité. Citons la sulfadiazine, le sulfamoxole, le sulfaméthoxazole, la sulfaguanidine, la salazosulfapyridine, le sulfadoxine. Le spectre des sulfamides est théoriquement large, mais certaines espèces présentent une résistance naturelle. De plus, nombreuses sont les souches, de toutes espèces, qui ont acquis une résistance. L'action des sulfamides est seulement bactériostatique.

### **1-2-10- Les 2-4 diaminopyrimidines**

Le plus utilisé est le triméthoprime. Leur activité est habituellement bactériostatique, parfois bactéricide. Leur spectre d'action est large, mais de nombreux groupes bactériens possèdent une résistance naturelle.

### **1-2-11- Associations sulfamides - diaminopyrimidines**

Les sulfamides et les 2-4 diaminopyrimidines sont fréquemment prescrits en association. Cette association est souvent synergique et bactéricide si la souche est sensible aux deux composés. La première association utilisée fût l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. D'autres diaminopyrimidines sont susceptibles d'être utilisées, tel le téroxoprime.

### **1-2-12- Les antifoliques**

Les sulfones sont comme les sulfamides, des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque (PAB) et sont utilisés dans le traitement de la lèpre. L'acide para-amino-salicylique (PAS), antituberculeux mineur, est un autre analogue structural du PA

### 1-2-13 Les Polypeptides.

Ce sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit : les polymyxines. Elles sont produites par diverses espèces de bacillus. Deux d'entre elles sont utilisées en thérapeutique, la polymyxine B et la Polymyxine E ou colistine.

## II. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES

### 2.1. Notion de résistance

Pour chaque antibiotique est défini un spectre d'activité c'est-à-dire l'éventail des espèces bactériennes "sensibles", susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique (surtout *in vivo* après utilisation d'une posologie standard).

Une espèce non sensible, qui n'entre pas dans le spectre d'activité d'un antibiotique, est dite résistante.

Cette résistance est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie.

Plusieurs définitions de la résistance des bactéries aux antibiotiques ont été retenues. Selon certains auteurs :

- une souche est dite "résistante" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

- une souche est dite résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte *in vivo*.

- une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique (19).

Il existe plusieurs types de résistances bactériennes aux antibiotiques

## 2.2. Types de résistance

### 2.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou “intrinsèque” correspond à la résistance de toutes les souches d’une même espèce ou d’un même genre bactérien à un antibiotique (69). Le mécanisme de cette résistance est variable mais son support génétique est généralement chromosomique. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l’espèce.

On peut citer les résistances naturelles des *Staphylococcus aureus* et Entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines ( Pénicilline G, Ampicilline et Cephalosporines), des *Streptococcus sp.* aux aminosides, des *Proteus mirabilis* aux tétracyclines.

### 2.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise correspond à l’acquisition d’une résistance à un antibiotique par une souche normalement sensible. Elle n’apparaît que chez quelques souches d’une espèce donnée normalement sensible, à l’inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l’espèce (22).

La résistance acquise est évolutive, elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie) ,de l’utilisation des antibiotiques.

L’acquisition de la résistance peut être liée à un apport plasmidique ou à une mutation chromosomique.

Cette résistance acquise observée *in vitro et in vivo* pour la plupart des bactéries et des antibiotiques rend nécessaire l’étude de la sensibilité des bactéries au laboratoire.

### 2.2.3. Résistance clinique

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

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

## 2. 3. Support génétique de la résistance

La cellule bactérienne contient un matériel génétique double :

- un chromosome, représentant le noyau de la cellule bactérienne, il est indispensable à la vie de la bactérie. Ce chromosome est constitué par un long filament d'ADN pelotonné et qui porte un grand nombre d'informations génétiques,

- la bactérie peut contenir, dans son cytoplasme, un ou plusieurs plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires, extrachromosomiques, douées de répllication autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations. En général, les plasmides naturels des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie hôte ().

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques est fonction d'une information portée par le code génétique.

La résistance peut être codée:

- par le chromosome bactérien ; elle est dite chromosomique
- ou par le plasmide ; elle est dite plasmidique (2).

### 2.3.1. Résistance chromosomique par mutation

L'acquisition de la résistance est due à la mutation d'un gène chromosomique

La mutation correspond à une addition, une délétion ou une substitution de bases dont la conséquence est une erreur de lecture du code génétique. Cette modification entraîne une résistance en :

- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- rendant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- ndant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- dant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- ant la cellule imperméable à ces antibiotiques
- nt la cellule imperméable à ces antibiotiques
- t la cellule imperméable à ces antibiotiques
- la cellule imperméable à ces antibiotiques

la cellule imperméable à ces antibiotiques  
 a cellule imperméable à ces antibiotiques  
 cellule imperméable à ces antibiotiques  
 cellule imperméable à ces antibiotiques  
 ellule imperméable à ces antibiotiques  
 llule imperméable à ces antibiotiques  
 lule imperméable à ces antibiotiques  
 ule imperméable à ces antibiotiques  
 le imperméable à ces antibiotiques  
 e imperméable à ces antibiotiques  
 imperméable à ces antibiotiques  
 imperméable à ces antibiotiques  
 mperméable à ces antibiotiques  
 perméable à ces antibiotiques  
 erméable à ces antibiotiques  
 rméable à ces antibiotiques  
 méable à ces antibiotiques  
 éable à ces antibiotiques  
 able à ces antibiotiques  
 ble à ces antibiotiques  
 le à ces antibiotiques  
 e à ces antibiotiques  
 à ces antibiotiques  
 à ces antibiotiques  
 ces antibiotiques  
 ces antibiotiques  
 es antibiotiques  
 s antibiotiques  
 antibiotiques  
 antibiotiques  
 ntibiotiques  
 tibirotiques  
 ibiotiques  
 biotiques  
 iotiques  
 otiques  
 tiques  
 iques  
 ques  
 ues  
 es  
 s

- rendant les cibles pariétales (protéines de liaison à la pénicil-lines par
- rendant les cibles pariétales (protéines de liaison à la pénicil-lines par











indifférentes à la présence du ou des antibiotiques.  
indifférentes à la présence du ou des antibiotiques.  
ndifférentes à la présence du ou des antibiotiques.  
différentes à la présence du ou des antibiotiques.  
ifférentes à la présence du ou des antibiotiques.  
fférentes à la présence du ou des antibiotiques.  
férentes à la présence du ou des antibiotiques.  
érentes à la présence du ou des antibiotiques.  
rentes à la présence du ou des antibiotiques.  
entes à la présence du ou des antibiotiques.  
ntes à la présence du ou des antibiotiques.  
tes à la présence du ou des antibiotiques.  
es à la présence du ou des antibiotiques.  
s à la présence du ou des antibiotiques.  
à la présence du ou des antibiotiques.  
à la présence du ou des antibiotiques.  
la présence du ou des antibiotiques.  
la présence du ou des antibiotiques.  
a présence du ou des antibiotiques.  
présence du ou des antibiotiques.  
présence du ou des antibiotiques.  
résence du ou des antibiotiques.  
ésence du ou des antibiotiques.  
sence du ou des antibiotiques.  
ence du ou des antibiotiques.  
nce du ou des antibiotiques.  
ce du ou des antibiotiques.  
e du ou des antibiotiques.  
du ou des antibiotiques.  
du ou des antibiotiques.  
u ou des antibiotiques.  
ou des antibiotiques.  
ou des antibiotiques.  
u des antibiotiques.  
des antibiotiques.  
des antibiotiques.  
es antibiotiques.  
s antibiotiques.  
antibiotiques.  
antibiotiques.  
ntibiotiques.  
tbiotiques.  
ibiotiques.  
biotiques.  
iotiques.

otiques.  
tiques.  
iques.  
ques.  
ues.  
es.  
s.  
.

- codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
- codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
- codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
codant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
odant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
dant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
ant pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
nt pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
t pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
pour la synthèse d'enzymes inactivantes.  
our la synthèse d'enzymes inactivantes.  
ur la synthèse d'enzymes inactivantes.  
r la synthèse d'enzymes inactivantes.  
la synthèse d'enzymes inactivantes.  
la synthèse d'enzymes inactivantes.  
a synthèse d'enzymes inactivantes.  
synthèse d'enzymes inactivantes.  
synthèse d'enzymes inactivantes.  
ynthèse d'enzymes inactivantes.  
nthèse d'enzymes inactivantes.  
thèse d'enzymes inactivantes.  
hèse d'enzymes inactivantes.  
èse d'enzymes inactivantes.  
se d'enzymes inactivantes.  
e d'enzymes inactivantes.  
d'enzymes inactivantes.  
d'enzymes inactivantes.  
'enzymes inactivantes.  
enzymes inactivantes.  
nzymes inactivantes.  
zymes inactivantes.  
ymes inactivantes.  
mes inactivantes.  
es inactivantes.

s inactivantes.  
 inactivantes.  
 inactivantes.  
 nactivantes.  
 activantes.  
 ctivantes.  
 tivantes.  
 ivantes.  
 vantes.  
 antes.  
 ntes.  
 tes.  
 es.  
 s.  
 .

La mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 La mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 a mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 mutation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 utation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 tation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 ation peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 tion peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 ion peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 on peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 n peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 peut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 eut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 ut intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 t intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 intervenir sur un ou plusieurs loci.  
 ntervenir sur un ou plusieurs loci.  
 tervenir sur un ou plusieurs loci.  
 ervenir sur un ou plusieurs loci.  
 rvenir sur un ou plusieurs loci.  
 venir sur un ou plusieurs loci.  
 enir sur un ou plusieurs loci.  
 nir sur un ou plusieurs loci.  
 ir sur un ou plusieurs loci.  
 r sur un ou plusieurs loci.  
 sur un ou plusieurs loci.

sur un ou plusieurs loci.  
 ur un ou plusieurs loci.  
 r un ou plusieurs loci.  
 un ou plusieurs loci.  
 un ou plusieurs loci.  
 n ou plusieurs loci.  
 ou plusieurs loci.  
 ou plusieurs loci.  
 u plusieurs loci.  
 plusieurs loci.  
 plusieurs loci.  
 lusieurs loci.  
 usieurs loci.  
 sieurs loci.  
 ieurs loci.  
 eurs loci.  
 urs loci.  
 rs loci.  
 s loci.  
 loci.  
 loci.  
 oci.  
 ci.  
 i.  
 .

Ce type de résistance est un phénomène :

Ce type de résistance est un phénomène :  
 e type de résistance est un phénomène :  
 type de résistance est un phénomène :  
 type de résistance est un phénomène :  
 ype de résistance est un phénomène :  
 pe de résistance est un phénomène :  
 e de résistance est un phénomène :  
 de résistance est un phénomène :  
 de résistance est un phénomène :  
 e résistance est un phénomène :  
 résistance est un phénomène :  
 résistance est un phénomène :  
 ésistance est un phénomène :  
 sistance est un phénomène :  
 istance est un phénomène :  
 stance est un phénomène :  
 tance est un phénomène :  
 ance est un phénomène :

nce est un phénomène :  
 ce est un phénomène :  
 e est un phénomène :  
   est un phénomène :  
 est un phénomène :  
 st un phénomène :  
 t un phénomène :  
   un phénomène :  
 un phénomène :  
 n phénomène :  
   phénomène :  
 phénomène :  
 hénomène :  
 énomène :  
 nomène :  
 omène :  
 mène :  
 ène :  
 ne :  
 e :  
 :  
 :

                  - spontané  
       - spontané  
 - spontané  
   spontané  
 spontané  
 pontané  
 ontané  
 ntané  
 tané  
 ané  
 né  
 é

                  - rare ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  
                   - rare ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  
 - rare ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
   rare ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 rare ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 are ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 re ( la fréquence des mutants dans une population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )



population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 population donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 opulation donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 pulation donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 ulation donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 lation donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 ation donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 tion donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 ion donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 on donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 n donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 donnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 onnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 nnée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 née est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 ée est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 e est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 est de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 st de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 t de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 e  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 $0^{-6}$  à  $10^{-9}$  )  
 $-6$  à  $10^{-9}$  )  
 $6$  à  $10^{-9}$  )  
 à  $10^{-9}$  )  
 à  $10^{-9}$  )  
 $10^{-9}$  )  
 $10^{-9}$  )  
 $0^{-9}$  )  
 $-9$  )  
 $9$  )







les populations sensibles  
les populations sensibles  
es populations sensibles  
s populations sensibles  
populations sensibles  
populations sensibles  
opulations sensibles  
pulations sensibles  
ulations sensibles  
lations sensibles  
ations sensibles  
tions sensibles  
ions sensibles  
ons sensibles  
ns sensibles  
s sensibles  
sensibles  
sensibles  
ensibles  
nsibles  
sibles  
ibles  
bles  
les  
es  
s

- spécifique

- spécifique

- spécifique  
spécifique  
spécifique  
pécifique  
écifique  
cifique  
ifique  
fique  
ique  
que  
ue  
e

- héréditaire et stable ( les fréquences de réversion sont équivalentes à

- héréditaire et stable ( les fréquences de réversion sont équivalentes à celles





ions) mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 ons) mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 ns) mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 s) mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 ) mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 mais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 ais non transmissibles en dehors de la progénie.  
 is non transmissibles en dehors de la progénie.  
 s non transmissibles en dehors de la progénie.  
 non transmissibles en dehors de la progénie.  
 non transmissibles en dehors de la progénie.  
 on transmissibles en dehors de la progénie.  
 n transmissibles en dehors de la progénie.  
 transmissibles en dehors de la progénie.  
 transmissibles en dehors de la progénie.  
 ransmissibles en dehors de la progénie.  
 ansmissibles en dehors de la progénie.  
 nsmissibles en dehors de la progénie.  
 smissibles en dehors de la progénie.  
 missibles en dehors de la progénie.  
 issibles en dehors de la progénie.  
 ssibles en dehors de la progénie.  
 sibles en dehors de la progénie.  
 ibles en dehors de la progénie.  
 bles en dehors de la progénie.  
 les en dehors de la progénie.  
 es en dehors de la progénie.  
 s en dehors de la progénie.  
 en dehors de la progénie.  
 en dehors de la progénie.  
 n dehors de la progénie.  
 dehors de la progénie.  
 dehors de la progénie.  
 ehors de la progénie.  
 hors de la progénie.  
 ors de la progénie.  
 rs de la progénie.  
 s de la progénie.  
 de la progénie.  
 de la progénie.  
 e la progénie.  
 la progénie.  
 la progénie.  
 a progénie.

progénie.  
 progénie.  
 rogénie.  
 ogénie.  
 génie.  
 énie.  
 nie.  
 ie.  
 e.  
 .

2.3.2. Résistance par acquisition de gène

.3.2. Résistance par acquisition de gène

3.2. Résistance par acquisition de gène

.2. Résistance par acquisition de gène

2. Résistance par acquisition de gène

. Résistance par acquisition de gène

Résistance par acquisition de gène

Résistance par acquisition de gène

ésistance par acquisition de gène

sistance par acquisition de gène

istance par acquisition de gène

stance par acquisition de gène

tance par acquisition de gène

ance par acquisition de gène

nce par acquisition de gène

ce par acquisition de gène

e par acquisition de gène

par acquisition de gène

par acquisition de gène

ar acquisition de gène

r acquisition de gène

acquisition de gène

acquisition de gène

cquisition de gène

quisition de gène

uisition de gène

isition de gène

sition de gène

ition de gène

tion de gène

ion de gène

on de gène

n de gène













ues. La résistance peut alors être due à :  
 es. La résistance peut alors être due à :  
 s. La résistance peut alors être due à :  
 . La résistance peut alors être due à :  
 La résistance peut alors être due à :  
 La résistance peut alors être due à :  
 a résistance peut alors être due à :  
 résistance peut alors être due à :  
 résistance peut alors être due à :  
 ésistance peut alors être due à :  
 sistance peut alors être due à :  
 istance peut alors être due à :  
 stance peut alors être due à :  
 tance peut alors être due à :  
 ance peut alors être due à :  
 nce peut alors être due à :  
 ce peut alors être due à :  
 e peut alors être due à :  
 peut alors être due à :  
 peut alors être due à :  
 eut alors être due à :  
 ut alors être due à :  
 t alors être due à :  
 alors être due à :  
 alors être due à :  
 lors être due à :  
 ors être due à :  
 rs être due à :  
 s être due à :  
 être due à :  
 être due à :  
 tre due à :  
 re due à :  
 e due à :  
 due à :  
 due à :  
 ue à :  
 e à :  
 à :  
 à :  
 :  
 :

- l'altération de la cible de l'antibiotique
- l'altération de la cible de l'antibiotique





ue (diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 e (diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 (diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 (diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 diminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 iminution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 minution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 inution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 nution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ution de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 tion de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ion de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 on de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 n de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 de l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 e l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 l'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 'import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 import actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 mport actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 port actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ort actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 rt actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 t actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 actif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ctif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 tif ou mise en œuvre d'un export actif )  
 if ou mise en œuvre d'un export actif )  
 f ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ou mise en œuvre d'un export actif )  
 ou mise en œuvre d'un export actif )  
 u mise en œuvre d'un export actif )  
 mise en œuvre d'un export actif )  
 mise en œuvre d'un export actif )  
 ise en œuvre d'un export actif )  
 se en œuvre d'un export actif )  
 e en œuvre d'un export actif )  
 en œuvre d'un export actif )  
 en œuvre d'un export actif )  
 n œuvre d'un export actif )  
 œuvre d'un export actif )  
 œuvre d'un export actif )



uvre d'un export actif )  
 vre d'un export actif )  
 re d'un export actif )  
 e d'un export actif )  
 d'un export actif )  
 d'un export actif )  
 'un export actif )  
 un export actif )  
 n export actif )  
 export actif )  
 export actif )  
 xport actif )  
 port actif )  
 ort actif )  
 rt actif )  
 t actif )  
 actif )  
 actif )  
 ctif )  
 tif )  
 if )  
 f )  
 )  
 )

- l'inactivation de l'antibiotique et  
 - l'inactivation de l'antibiotique et  
 - l'inactivation de l'antibiotique et  
 l'inactivation de l'antibiotique et  
 l'inactivation de l'antibiotique et  
 'inactivation de l'antibiotique et  
 inactivation de l'antibiotique et  
 nactivation de l'antibiotique et  
 activation de l'antibiotique et  
 ctivation de l'antibiotique et  
 tivation de l'antibiotique et  
 ivation de l'antibiotique et  
 vation de l'antibiotique et  
 ation de l'antibiotique et  
 tion de l'antibiotique et  
 ion de l'antibiotique et  
 on de l'antibiotique et  
 n de l'antibiotique et  
 de l'antibiotique et  
 de l'antibiotique et

e l'antibiotique et  
 l'antibiotique et  
 l'antibiotique et  
 'antibiotique et  
 antibiotique et  
 ntibiotique et  
 tibiotique et  
 ibiotique et  
 biotique et  
 iotique et  
 otique et  
 tique et  
 ique et  
 que et  
 ue et  
 e et  
 et  
 et  
 t

- la substitution de la cible de l'antibiotique.

- la substitution de la cible de l'antibiotique.

- la substitution de la cible de l'antibiotique.

la substitution de la cible de l'antibiotique.

la substitution de la cible de l'antibiotique.

a substitution de la cible de l'antibiotique.

substitution de la cible de l'antibiotique.

substitution de la cible de l'antibiotique.

ubstitution de la cible de l'antibiotique.

bstitution de la cible de l'antibiotique.

stitution de la cible de l'antibiotique.

titution de la cible de l'antibiotique.

itution de la cible de l'antibiotique.

tution de la cible de l'antibiotique.

ution de la cible de l'antibiotique.

tion de la cible de l'antibiotique.

ion de la cible de l'antibiotique.

on de la cible de l'antibiotique.

n de la cible de l'antibiotique.

de la cible de l'antibiotique.

de la cible de l'antibiotique.

e la cible de l'antibiotique.

la cible de l'antibiotique.

la cible de l'antibiotique.









niveau du chromosome, sur des plasmides :  
niveau du chromosome, sur des plasmides :  
iveau du chromosome, sur des plasmides :  
veau du chromosome, sur des plasmides :  
eau du chromosome, sur des plasmides :  
au du chromosome, sur des plasmides :  
u du chromosome, sur des plasmides :  
du chromosome, sur des plasmides :  
du chromosome, sur des plasmides :  
u chromosome, sur des plasmides :  
chromosome, sur des plasmides :  
chromosome, sur des plasmides :  
hromosome, sur des plasmides :  
romosome, sur des plasmides :  
omosome, sur des plasmides :  
mosome, sur des plasmides :  
osome, sur des plasmides :  
some, sur des plasmides :  
ome, sur des plasmides :  
me, sur des plasmides :  
e, sur des plasmides :  
, sur des plasmides :  
sur des plasmides :  
sur des plasmides :  
ur des plasmides :  
r des plasmides :  
des plasmides :  
des plasmides :  
es plasmides :  
s plasmides :  
plasmides :  
plasmides :  
lasmides :  
asmides :  
smides :  
mides :  
ides :  
des :  
es :  
s :  
:  
:

exemple 1 ; gène codant pour la résistance des *Staphylococcus. aureus* à la  
exemple 1 ; gène codant pour la résistance des *Staphylococcus. aureus* à la





*Staphylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*Staphylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*taphylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*aphylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*phylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*hylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*ylococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*lococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*ococcus. aureus* à la méticilline (11).  
*coccus. aureus* à la méticilline (11).  
*occus. aureus* à la méticilline (11).  
*ccus. aureus* à la méticilline (11).  
*cus. aureus* à la méticilline (11).  
*us. aureus* à la méticilline (11).  
*s. aureus* à la méticilline (11).  
*. aureus* à la méticilline (11).  
*aureus* à la méticilline (11).  
*aureus* à la méticilline (11).  
*ureus* à la méticilline (11).  
*reus* à la méticilline (11).  
*eus* à la méticilline (11).  
*us* à la méticilline (11).  
*s* à la méticilline (11).  
à la méticilline (11).  
à la méticilline (11).  
la méticilline (11).  
la méticilline (11).  
a méticilline (11).  
méticilline (11).  
méticilline (11).  
éticilline (11).  
ticilline (11).  
icilline (11).  
cilline (11).  
illine (11).  
lline (11).  
line (11).  
ine (11).  
ne (11).  
e (11).  
(11).  
(11).  
11).  
1).  
).









s variées d'Entérobactéries (61).  
 variées d'Entérobactéries (61).  
 variées d'Entérobactéries (61).  
 ariées d'Entérobactéries (61).  
 riées d'Entérobactéries (61).  
 iées d'Entérobactéries (61).  
 ées d'Entérobactéries (61).  
 es d'Entérobactéries (61).  
 s d'Entérobactéries (61).  
 d'Entérobactéries (61).  
 d'Entérobactéries (61).  
 'Entérobactéries (61).  
 Entérobactéries (61).  
 ntérobactéries (61).  
 térobactéries (61).  
 érobactéries (61).  
 robactéries (61).  
 obactéries (61).  
 bactéries (61).  
 actéries (61).  
 ctéries (61).  
 téries (61).  
 éries (61).  
 ries (61).  
 ies (61).  
 es (61).  
 s (61).  
 (61).  
 (61).  
 61).  
 1).  
 ).  
 .

**2.3.3.** Résistance par dérégulation de gène

**.3.3.** Résistance par dérégulation de gène

**3.3.** Résistance par dérégulation de gène

**.3.** Résistance par dérégulation de gène

**3.** Résistance par dérégulation de gène

**.** Résistance par dérégulation de gène

Résistance par dérégulation de gène

Résistance par dérégulation de gène

ésistance par dérégulation de gène

sistance par dérégulation de gène

istance par dérèpression de gène  
 stance par dérèpression de gène  
 tance par dérèpression de gène  
 ance par dérèpression de gène  
 nce par dérèpression de gène  
 ce par dérèpression de gène  
 e par dérèpression de gène  
 par dérèpression de gène  
 par dérèpression de gène  
 ar dérèpression de gène  
 r dérèpression de gène  
 dérèpression de gène  
 dérèpression de gène  
 érèpression de gène  
 répression de gène  
 épession de gène  
 pression de gène  
 ression de gène  
 ession de gène  
 ssion de gène  
 sion de gène  
 ion de gène  
 on de gène  
 n de gène  
 de gène  
 de gène  
 e gène  
 gène  
 gène  
 ène  
 ne  
 e

Le patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un  
 Le patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène  
 e patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant  
 patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant  
 patrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant  
 atrimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant  
 trimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant  
 rimoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour  
 imoine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour  
 moine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour  
 oine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour la  
 ine génétique d'une bactérie peut naturellement renfermer un gène codant pour la









s, quinolones, etc...) (66,71).  
 , quinolones, etc...) (66,71).  
 quinolones, etc...) (66,71).  
 quinolones, etc...) (66,71).  
 uinolones, etc...) (66,71).  
 inolones, etc...) (66,71).  
 nolones, etc...) (66,71).  
 olones, etc...) (66,71).  
 lones, etc...) (66,71).  
 ones, etc...) (66,71).  
 nes, etc...) (66,71).  
 es, etc...) (66,71).  
 s, etc...) (66,71).  
 , etc...) (66,71).  
 etc...) (66,71).  
 etc...) (66,71).  
 tc...) (66,71).  
 c...) (66,71).  
 ...) (66,71).  
 ..) (66,71).  
 .) (66,71).  
 ) (66,71).  
 (66,71).  
 (66,71).  
 66,71).  
 6,71).  
 ,71).  
 71).  
 1).  
 ).  
 .

Ce gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 Ce gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 e gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 gène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 ène est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 ne est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 e est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène  
 est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur  
 est cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur  
 st cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur  
 t cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur en  
 cependant non exprimé par suite d'un blocage par le produit du gène répresseur en















on de souches résistantes aux molécules concernées.  
n de souches résistantes aux molécules concernées.  
de souches résistantes aux molécules concernées.  
de souches résistantes aux molécules concernées.  
e souches résistantes aux molécules concernées.  
souches résistantes aux molécules concernées.  
souches résistantes aux molécules concernées.  
ouches résistantes aux molécules concernées.  
uches résistantes aux molécules concernées.  
ches résistantes aux molécules concernées.  
hes résistantes aux molécules concernées.  
es résistantes aux molécules concernées.  
s résistantes aux molécules concernées.  
résistantes aux molécules concernées.  
résistantes aux molécules concernées.  
ésistantes aux molécules concernées.  
sistantes aux molécules concernées.  
istantes aux molécules concernées.  
stantes aux molécules concernées.  
tantes aux molécules concernées.  
antes aux molécules concernées.  
ntes aux molécules concernées.  
tes aux molécules concernées.  
es aux molécules concernées.  
s aux molécules concernées.  
aux molécules concernées.  
aux molécules concernées.  
ux molécules concernées.  
x molécules concernées.  
molécules concernées.  
molécules concernées.  
olécules concernées.  
lécules concernées.  
écules concernées.  
cules concernées.  
ules concernées.  
les concernées.  
es concernées.  
s concernées.  
concernées.  
concernées.  
oncernées.  
ncernées.  
cernées.  
ernées.







l'antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 l'antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 'antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 antibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 ntibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 tibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 ibiothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 biothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 iothérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 othérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 thérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 hérapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 érapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 rapie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 apie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 pie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 ie si un mécanisme d'induction est en cause.  
 e si un mécanisme d'induction est en cause.  
 si un mécanisme d'induction est en cause.  
 si un mécanisme d'induction est en cause.  
 i un mécanisme d'induction est en cause.  
 un mécanisme d'induction est en cause.  
 un mécanisme d'induction est en cause.  
 n mécanisme d'induction est en cause.  
 mécanisme d'induction est en cause.  
 mécanisme d'induction est en cause.  
 écanisme d'induction est en cause.  
 canisme d'induction est en cause.  
 anisme d'induction est en cause.  
 nisme d'induction est en cause.  
 isme d'induction est en cause.  
 sme d'induction est en cause.  
 me d'induction est en cause.  
 e d'induction est en cause.  
 d'induction est en cause.  
 d'induction est en cause.  
 'induction est en cause.  
 induction est en cause.  
 nduction est en cause.  
 duction est en cause.  
 uction est en cause.  
 ction est en cause.  
 tion est en cause.  
 ion est en cause.  
 on est en cause.

n est en cause.  
 est en cause.  
 est en cause.  
 st en cause.  
 t en cause.  
 en cause.  
 en cause.  
 n cause.  
 cause.  
 cause.  
 ause.  
 use.  
 se.  
 e.  
 .

2.4. Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 .4. Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 4. Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 . Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 Mécanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 écanismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 canismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 anismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 nismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 ismes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 smes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 mes de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 es de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 s de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 de résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 e résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 résistance aux bêtalactamines (figure10)  
 ésistance aux bêtalactamines (figure10)  
 sistance aux bêtalactamines (figure10)  
 istance aux bêtalactamines (figure10)  
 stance aux bêtalactamines (figure10)  
 tance aux bêtalactamines (figure10)  
 ance aux bêtalactamines (figure10)  
 nce aux bêtalactamines (figure10)  
 ce aux bêtalactamines (figure10)

e aux bêtalactamines (figure10)  
 aux bêtalactamines (figure10)  
 aux bêtalactamines (figure10)  
 ux bêtalactamines (figure10)  
 x bêtalactamines (figure10)  
 bêtalactamines (figure10)  
 bêtalactamines (figure10)  
 étalactamines (figure10)  
 talactamines (figure10)  
 alactamines (figure10)  
 lactamines (figure10)  
 actamines (figure10)  
 ctamines (figure10)  
 tamines (figure10)  
 amines (figure10)  
 mines (figure10)  
 ines (figure10)  
 nes (figure10)  
 es (figure10)  
 s (figure10)  
 (figure10)  
 (figure10)  
 figure10)  
 igure10)  
 gure10)  
 ure10)  
 re10)  
 e10)  
 10)  
 0)  
 )

Les  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 Les  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 es  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 s  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en  
 actamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.  
 ctamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.  
 tamines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.  
 amines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.  
 mines constituent la principale famille d'antibiotiques utilisée en thérapeutique.





biotiques utilisée en thérapeutique.  
 iotiques utilisée en thérapeutique.  
 otiques utilisée en thérapeutique.  
 tiques utilisée en thérapeutique.  
 iques utilisée en thérapeutique.  
 ques utilisée en thérapeutique.  
 ues utilisée en thérapeutique.  
 es utilisée en thérapeutique.  
 s utilisée en thérapeutique.  
 utilisée en thérapeutique.  
 utilisée en thérapeutique.  
 tilisée en thérapeutique.  
 ilisée en thérapeutique.  
 lisée en thérapeutique.  
 isée en thérapeutique.  
 sée en thérapeutique.  
 ée en thérapeutique.  
 e en thérapeutique.  
 en thérapeutique.  
 en thérapeutique.  
 n thérapeutique.  
 thérapeutique.  
 thérapeutique.  
 hérapeutique.  
 érapeutique.  
 rapeutique.  
 apeutique.  
 peutique.  
 eutique.  
 utique.  
 tique.  
 ique.  
 que.  
 ue.  
 e.  
 .

Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par  
 Ces molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation  
 es molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation  
 s molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur  
 molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur  
 molécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur  
 olécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur les  
 lécules agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation sur les







nt en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la  
t en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse  
du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la  
conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le  
mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèce  
bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces  
antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les  
espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

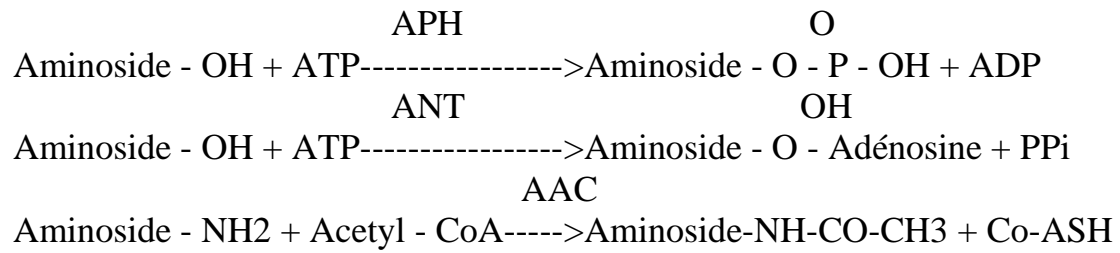


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

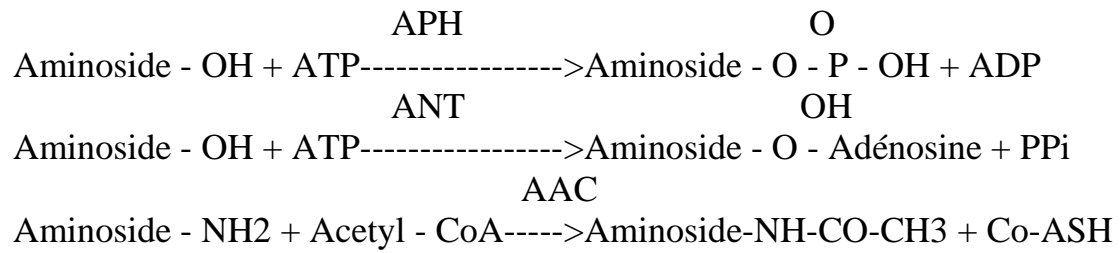


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>										
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>									
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>								Ampicilline,	
	Amoxicilline,									
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
		S	R							
		S	R							
	R Ticarcilline,									
	Pipéracilline, Mezlocilline	S								
		S	R							
		I	S							
	S Mécillinam	S	I							
	<i>Céphalosporines :</i>									
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S					Pase bas niveau	Cse bas
	niveau									
	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE								Pase haut niveau	BSE
	niveau									Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,									
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R								
		R	R							
		R	R							
	R Ticarcilline,									
	Pipéracilline, Mezlocilline	R								
		R	R							
		R	S							
	S Mécillinam	R	R	S/R						
	<i>Céphalosporines :</i>									
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		R								
		S								
		S								
		R								
		R								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam,									
	Aztreonam	S								
		S	S							

R S

S Imipenem S S S

en fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

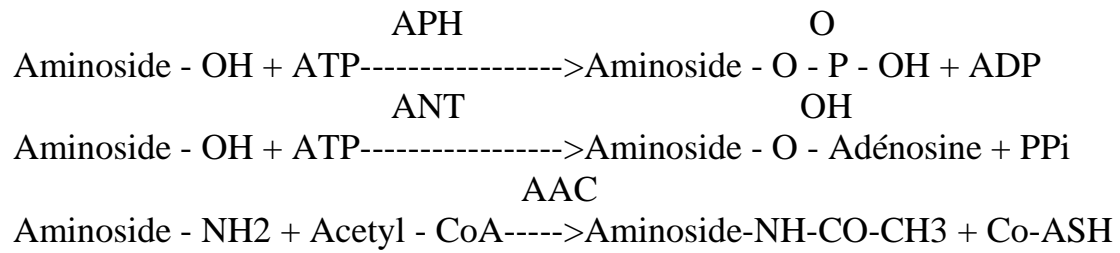


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

n fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

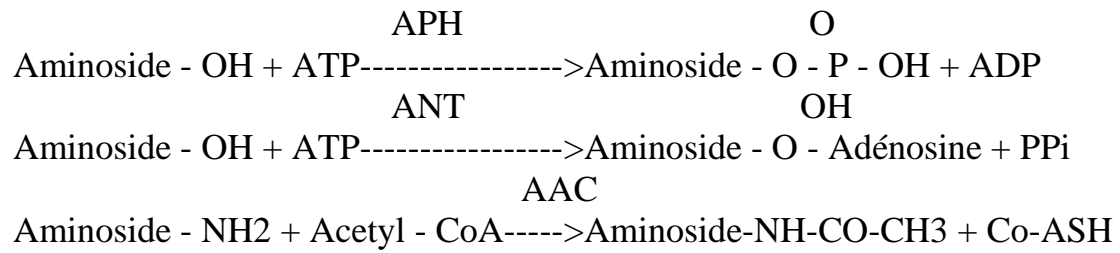


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>	
<i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan	
S	
S	
S	
S	
S	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
niveau	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
R	R
R	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	R
R	R
R	S
S	Mécillinam R R S/R Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan	
R	
S	
S	
R	
R	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam,
Aztreonam	S
S	S

R S

S Imipenem S S S

fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation	Type	Classe	Inductibilité	Activité référentielle
Péni	CSP	Inhibée par		
Cloxa	PCMB	Principaux germes	Chr Case Ia I -	
+++	S R	Entérobacter	Chr Case Ib C - + S R E.	
<i>coli</i>	Chr Case Ic I - ++	S R	Proteus vulgaris	Chr Case Id I -
+ S R	Pseudomonas aeruginosa	Chr Pase II C ++ - S R	Proteus mirabilis	Pl Case III C +++ + S R
TEM	Chr Case IV C + + R S	Klebsiella		
species	Pl Pase V C ++ - R S	Médiation plasmidique type OXA,		

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

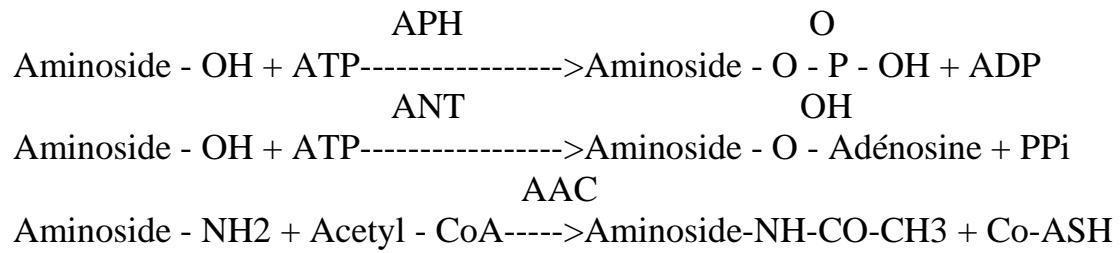


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

fait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

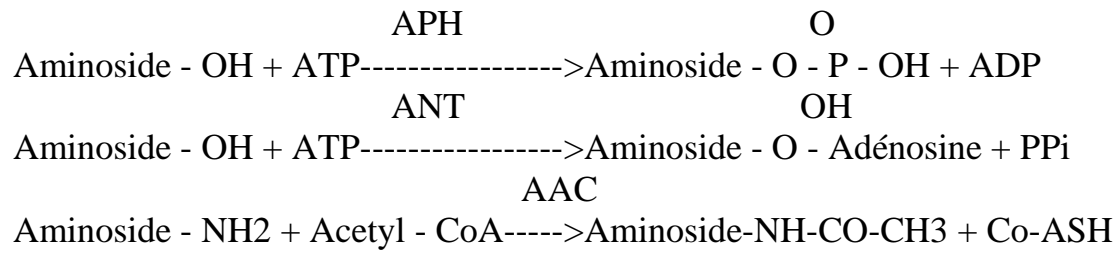


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ait des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



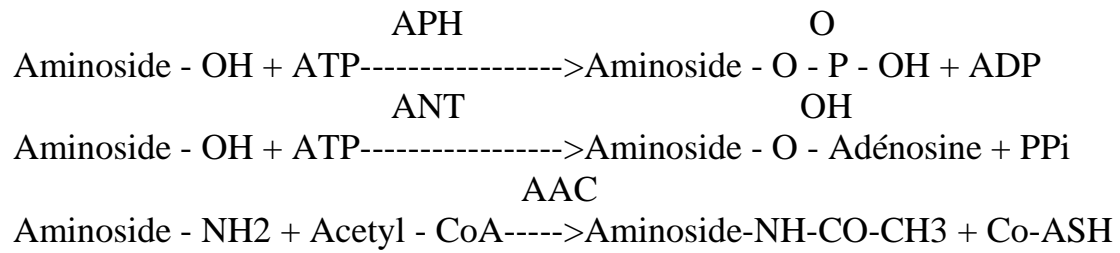


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

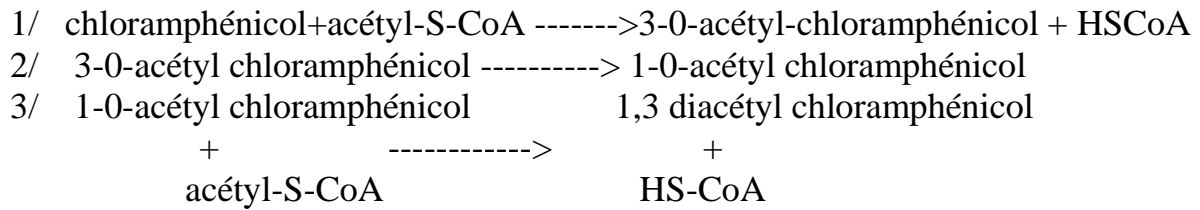
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques  
 soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>									
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>								
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>								Ampicilline,
	Amoxicilline,								
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S							
		S	R						
		S	R						
	R Ticarcilline,								
	Pipéracilline, Mezlocilline	S							
		S	R						
		I	S						
	S Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>					
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone								
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim								
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan								
		S							
		S							
		S							
		S							
		S							
		S							
		R							
		S							
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau Cse bas
	niveau PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE								Pase haut niveau BSE Case haut
	niveau Ampicilline, Amoxicilline,								
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R							
		R	R						
		R	R						
	R Ticarcilline,								
	Pipéracilline, Mezlocilline	R							
		R	R						
		R	S						
	S Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>				
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone								
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim								
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan								
		R							
		S							
		S							
		R							
		R							
		S							
		R							
		S							
	S/R Moxalactam,								
	Aztreonam	S							
		S	S						

R S

S Imipenem S S S

it des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

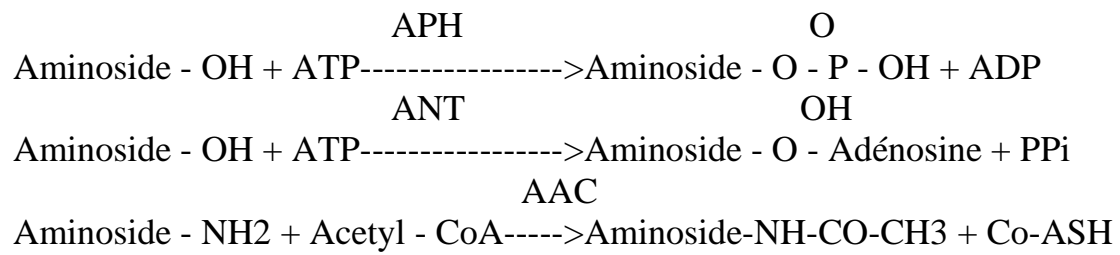


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>	
<i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan	
S	
S	
S	
S	
S	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
R	R
R	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	R
R	R
R	S
S	Mécillinam R R S/R Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan	
R	
S	
S	
R	
R	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam,
Aztreonam	S
S	S

R S

S Imipenem S S S

t des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

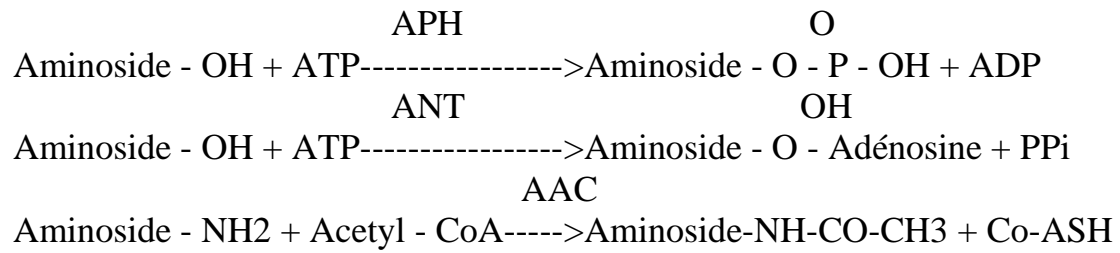
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

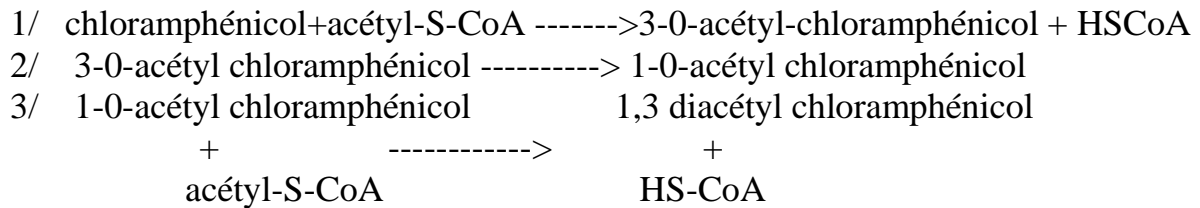
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bêtalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>									
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>								
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>							Ampicilline,	
Amoxicilline,									
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
	S	R							
	S	R							
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	S								
	S	R							
	I	S							
S	Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>					
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
	S								
	S								
	S								
	S								
	S								
	S								
	R								
	S								
S/R	Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau Cse bas
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE								Pase haut niveau BSE Case haut
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,								
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R							
		R	R						
		R	R						
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	R								
	R	R							
	R	S							
S	Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>				
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
	R								
	S								
	S								
	R								
	R								
	S								
	R								
	S								
S/R	Moxalactam,								
Aztreonam	S								
	S	S							



R S

S Imipenem S S S

des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

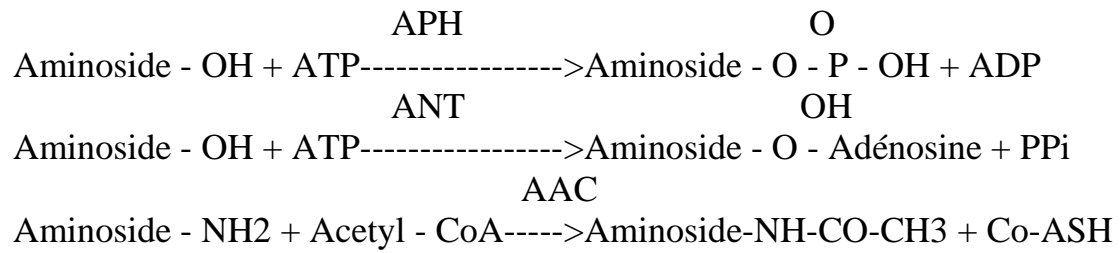


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

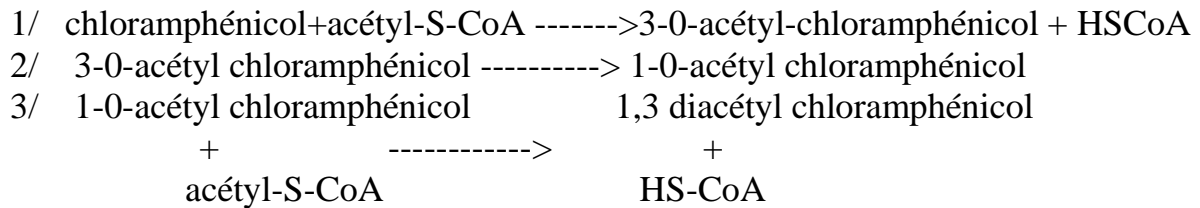
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bêtalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprim).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprim (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprim, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

des enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

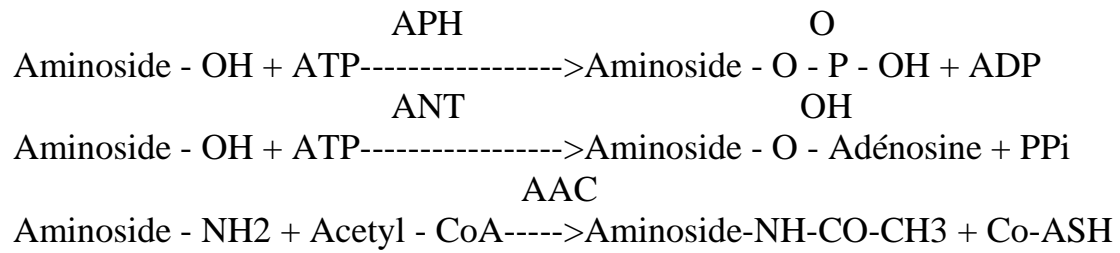
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

es enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

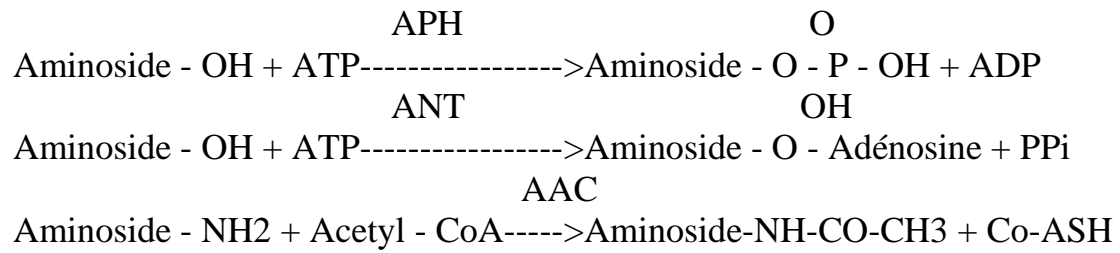


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

s enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonococque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

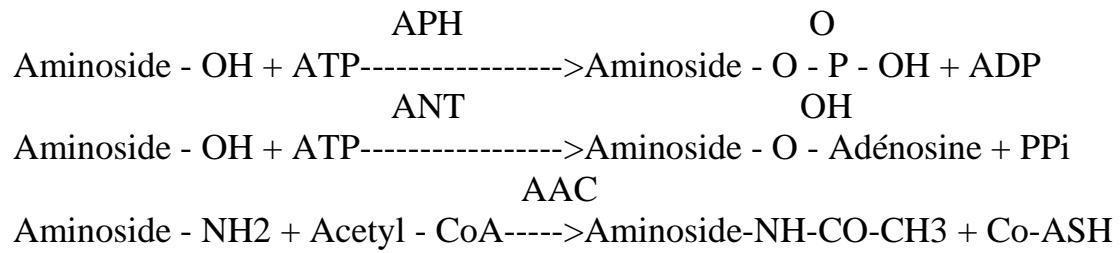
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide) ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :  
- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

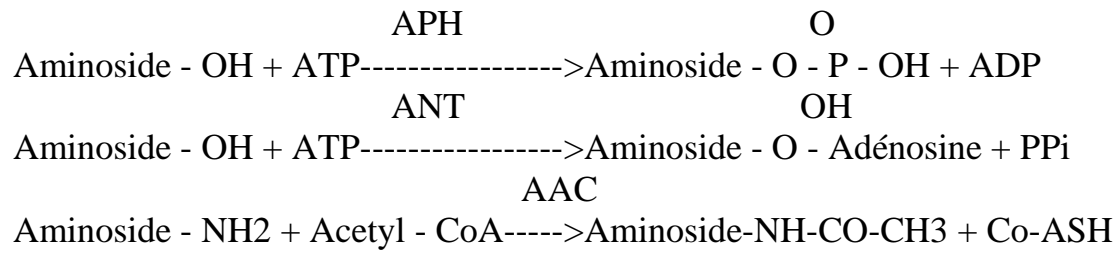
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide) ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :  
- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

enzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

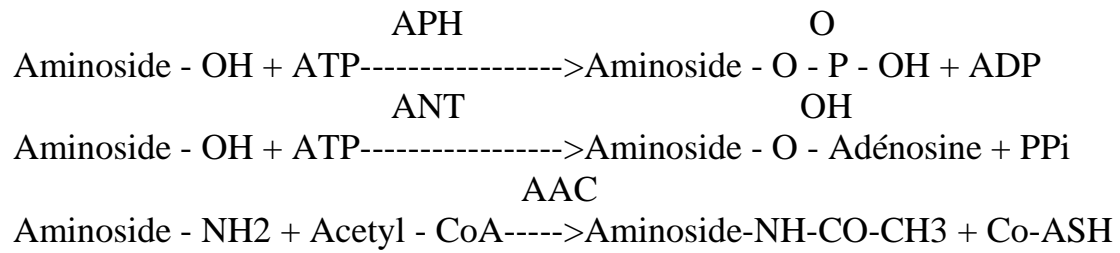
- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.





**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

## PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>							
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>						
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>						Ampicilline,
							Amoxicilline,
							Amoxicilline + Ac. Clavulanique
							S R
							S R
							R Ticarcilline,
							Pipéracilline, Mezlocilline
							S
							S R
							I S
							S Mécillinam
							S I
							<i>Céphalosporines :</i>
							Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
							Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
							<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
							S
							S
							S
							S
							S
							S
							S
							R
							S/R Moxalactam, Aztreonam
							S S S
							Imipenem
							S S S
							Pase bas niveau
							Cse bas
							niveau
							PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
							Pase haut niveau
							BSE
							Case haut
							niveau
							Ampicilline, Amoxicilline,
							Amoxicilline + Ac. Clavulanique
							R
							R R
							R R
							R Ticarcilline,
							Pipéracilline, Mezlocilline
							R
							R R
							R S
							S Mécillinam
							R R
							S/R
							<i>Céphalosporines :</i>
							Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
							Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
							<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
							R
							S
							S
							R
							R
							S
							R
							S
							S/R Moxalactam,
							Aztreonam
							S
							S S

R S

S Imipenem S S S

nzymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

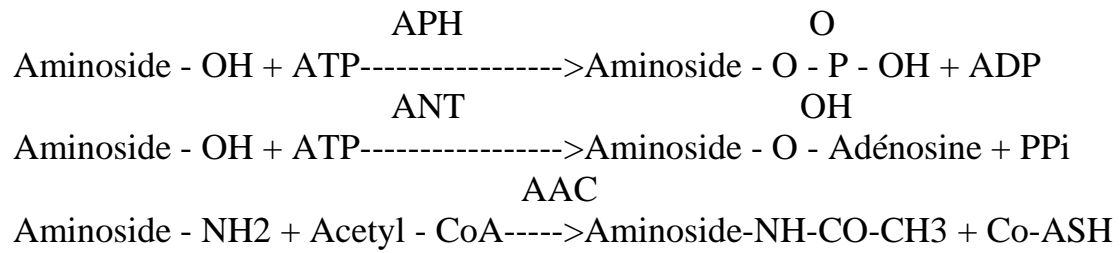


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

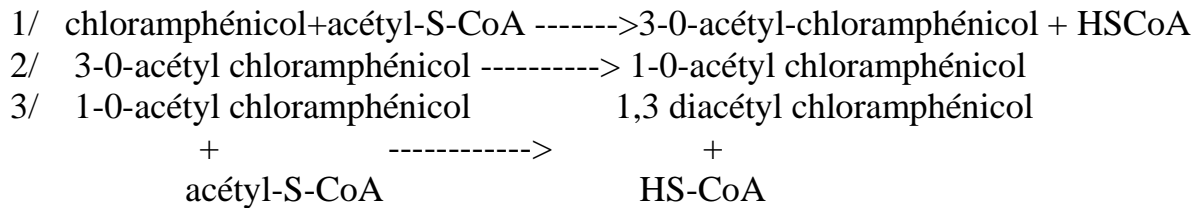
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Ampicilline,	
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
	Imipenem S S S
	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Pase haut niveau BSE Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

zymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

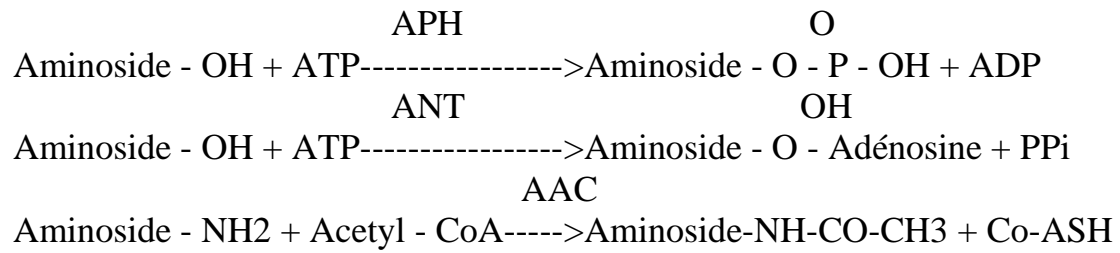
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

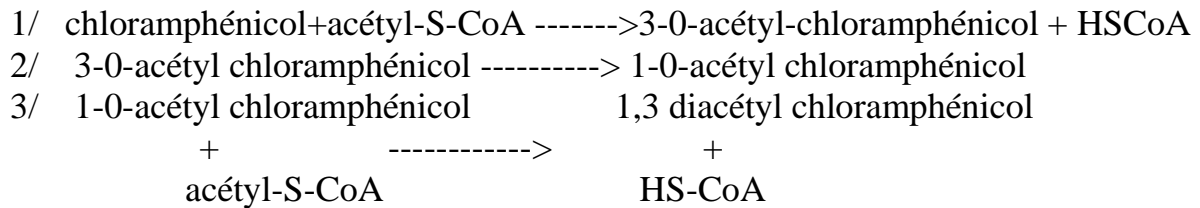
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux β-lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>									
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>								
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>								Ampicilline,
Amoxicilline,									
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
S	R								
S	R								
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	S								
S	R								
I	S								
S	Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>					
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
S									
S									
S									
S									
S									
S									
R									
S									
S/R	Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau Cse bas
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE								Pase haut niveau BSE Case haut
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,								
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R								
R	R								
R	R								
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	R								
R	R								
R	S								
S	Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>				
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
R									
S									
S									
R									
R									
S									
R									
S									
S/R	Moxalactam,								
Aztreonam	S								
S	S								



R S

S Imipenem S S S

ymes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

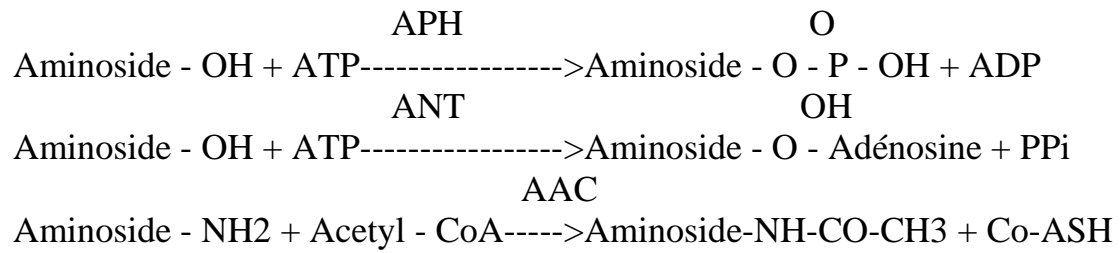


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

mes (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

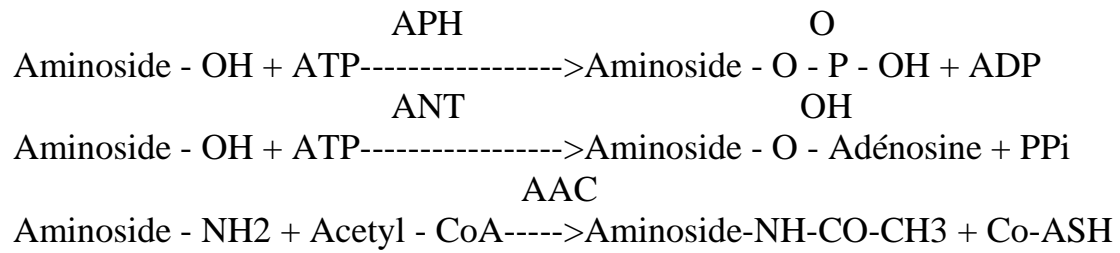


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux β-lactamines

## PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>									
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>								
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,							
Amoxicilline,									
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
S	R								
S	R								
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	S								
S	R								
I	S								
S	Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>					
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
S									
S									
S									
S									
S									
S									
R									
S									
S/R	Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau Cse bas
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE				Pase haut niveau	BSE	Case haut		
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,								
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R								
R	R								
R	R								
R	Ticarcilline,								
Pipéracilline, Mezlocilline	R								
R	R								
R	S								
S	Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>				
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
R									
S									
S									
R									
R									
S									
R									
S									
S/R	Moxalactam,								
Aztreonam	S								
S	S								

R S

S Imipenem S S S

es (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

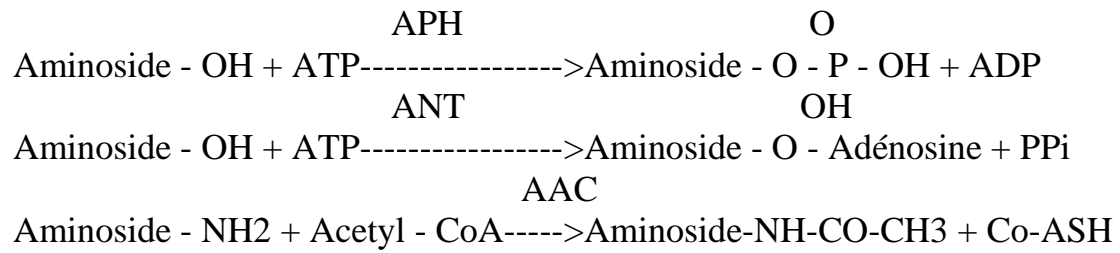
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

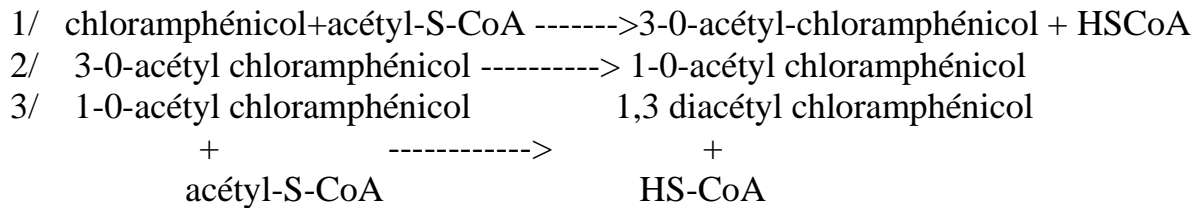
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprième).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprième (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprième, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques  
soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

s (transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

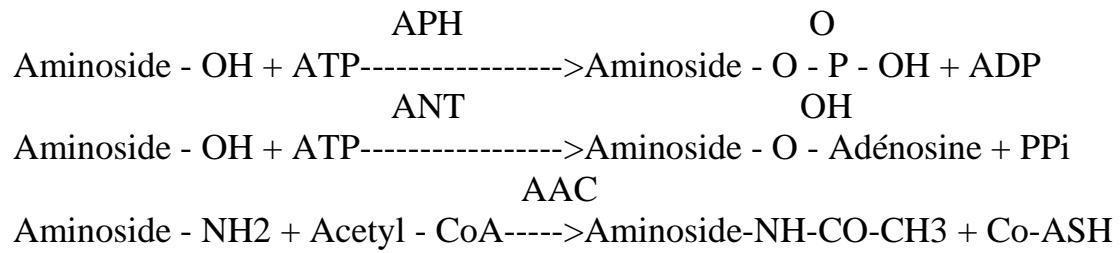
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

(transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

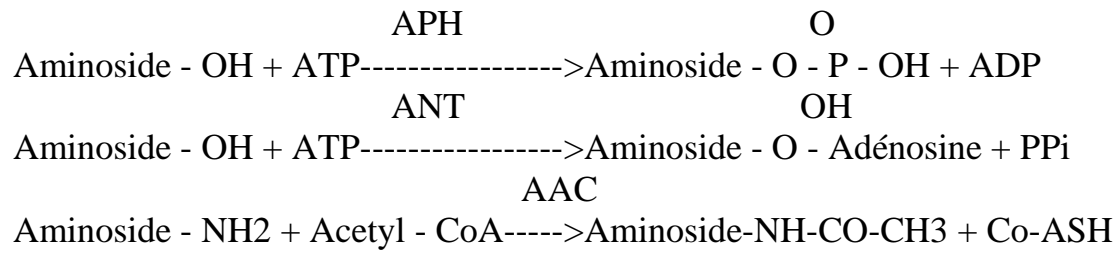


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

(transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

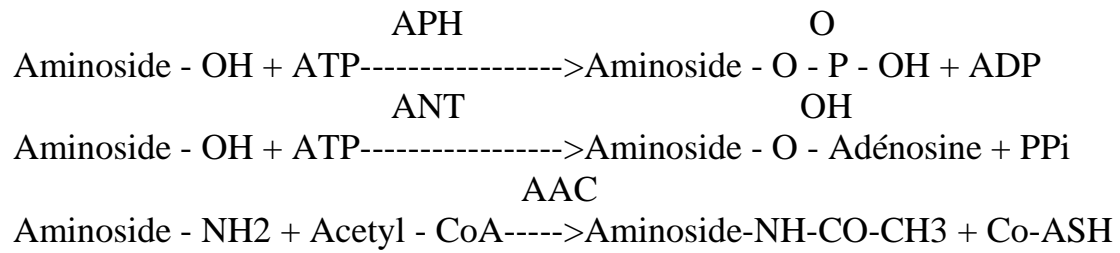
- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.





**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

transpeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

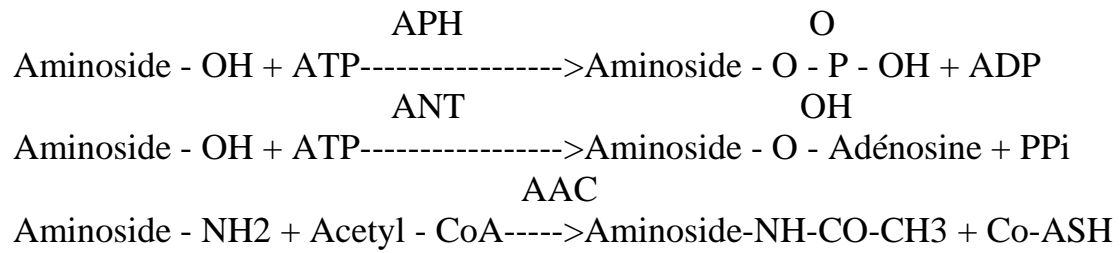


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ranspeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

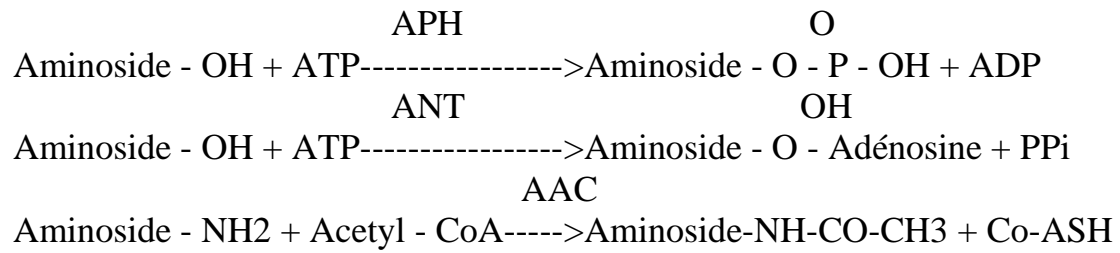


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

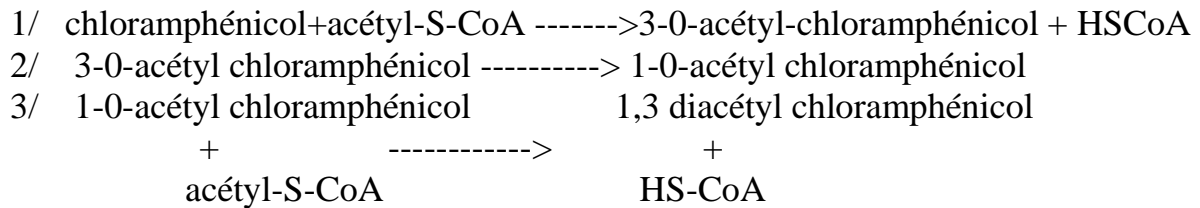
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>							
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>							
<i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>							Ampicilline,
Amoxicilline,							
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S	R					
S	R						
S	R						
R	Ticarcilline,						
Pipéracilline, Mezlocilline	S						
S	R						
I	S						
S	Mécillinam	S	I				<i>Céphalosporines :</i>
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone							
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim							
<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan							
S							
S							
S							
S							
S							
S							
R							
S							
S/R	Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE					S	S
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,						
Ampicilline + Ac. Clavulanique	R						Pase bas niveau Cse bas
R	R						Pase haut niveau BSE Case haut
R	R						
R	Ticarcilline,						
Pipéracilline, Mezlocilline	R						
R	R						
R	S						
S	Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>		
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone							
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim							
<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan							
R							
S							
S							
R							
R							
S							
R							
S							
S/R	Moxalactam,						
Aztreonam	S						
S	S						



R S

S Imipenem S S S

anséptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

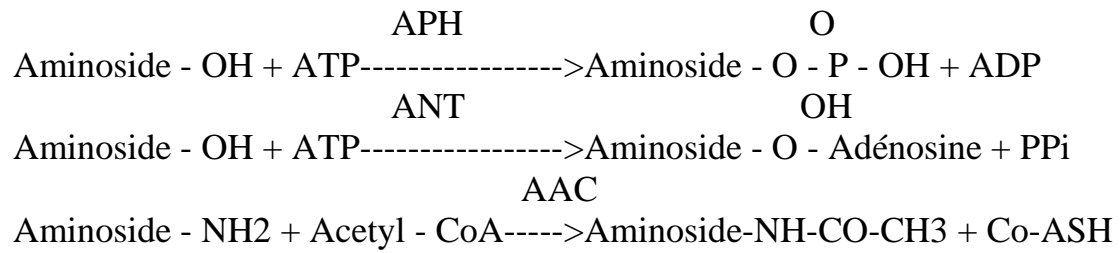


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

nspeptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque* Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

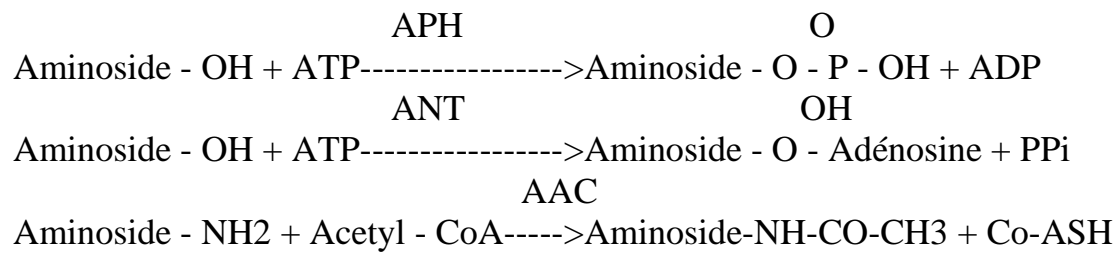


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

speptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

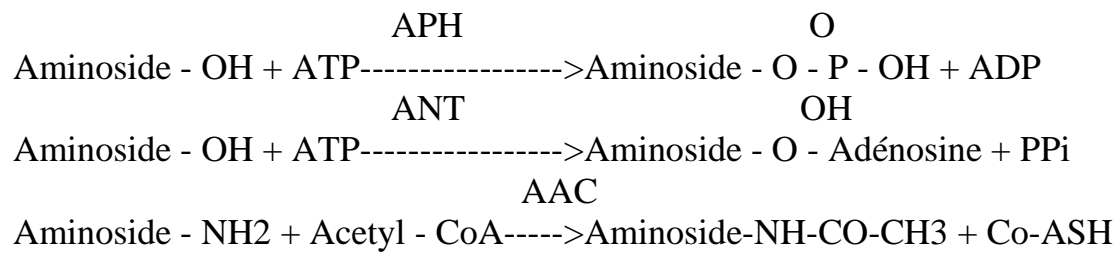


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

peptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

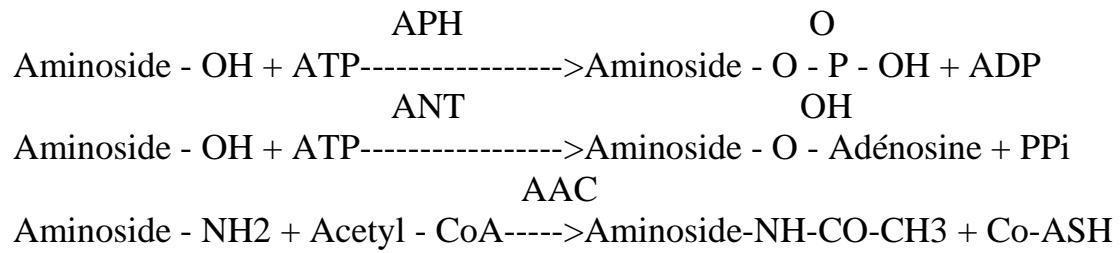


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>	
<i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Pase haut niveau BSE Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline
	R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam
	S
	S S

R S

S Imipenem S S S

eptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

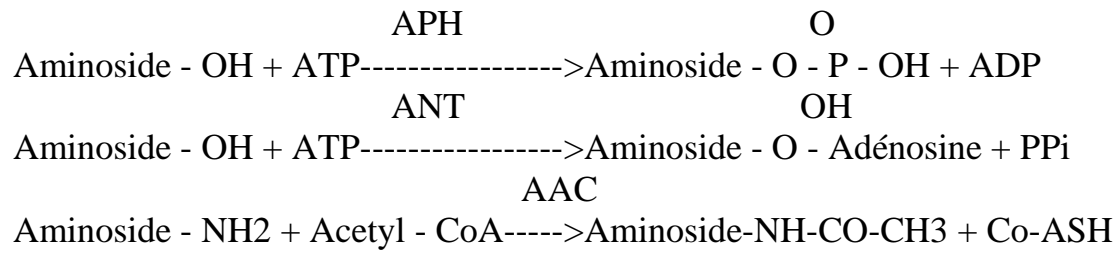
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ptidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



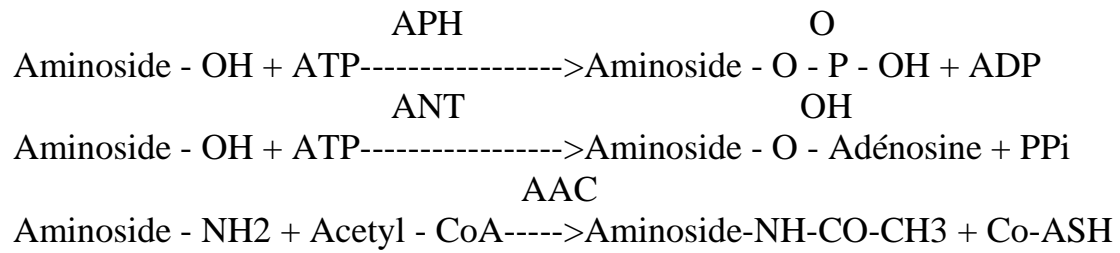


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Amoxicilline,	Ampicilline,
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Pase haut niveau BSE Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

tidase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

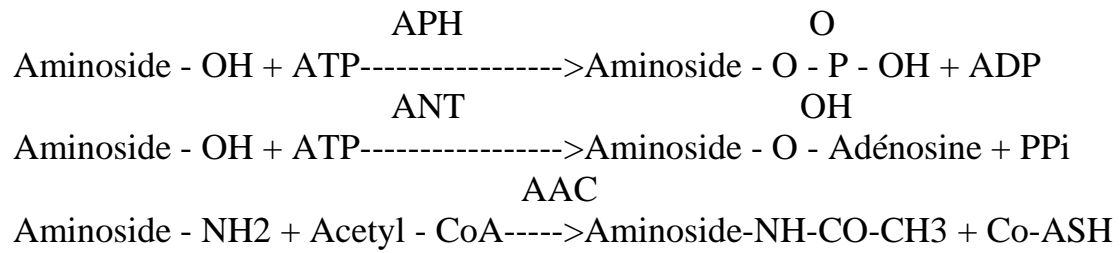


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide) ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :  
 - directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
 indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

idase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonococque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

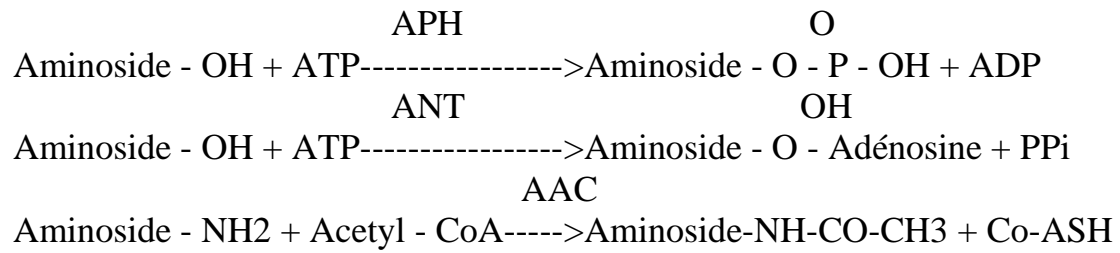
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

dase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

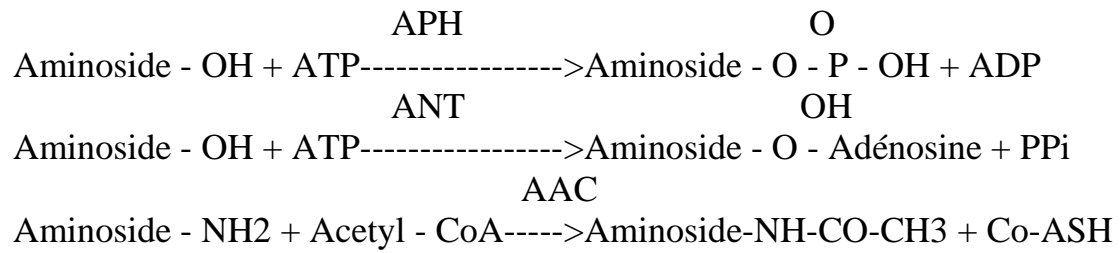


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Ampicilline,	
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
	Imipenem S S S
	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Pase haut niveau BSE Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

ase et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

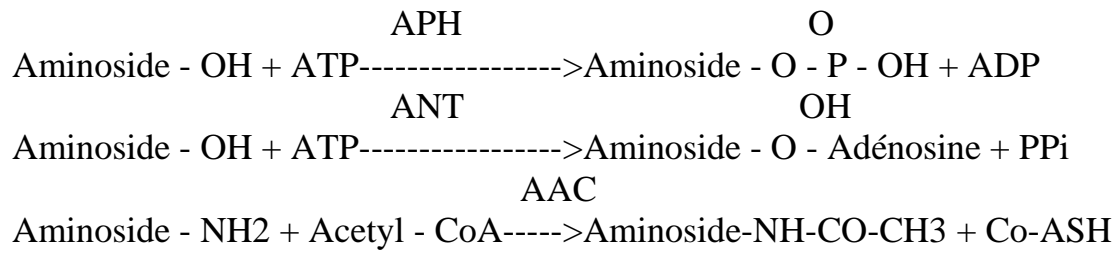


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

se et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

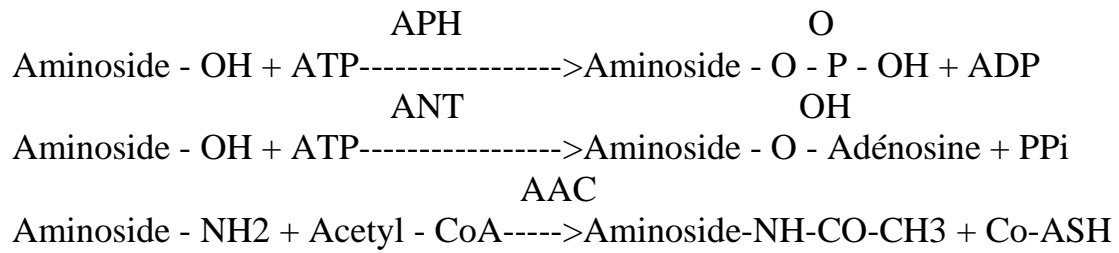


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

e et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*



- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2 ) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

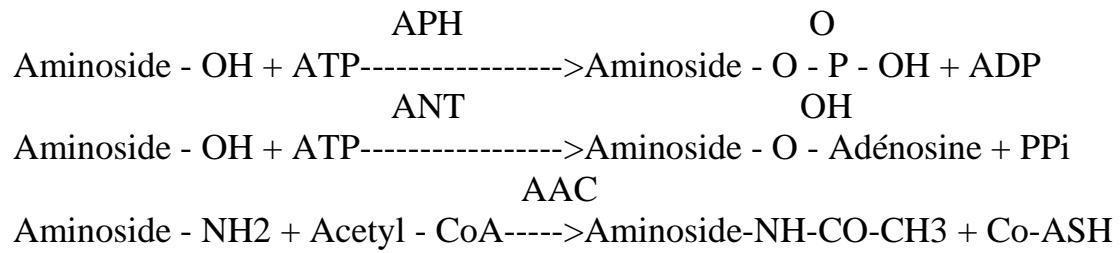


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

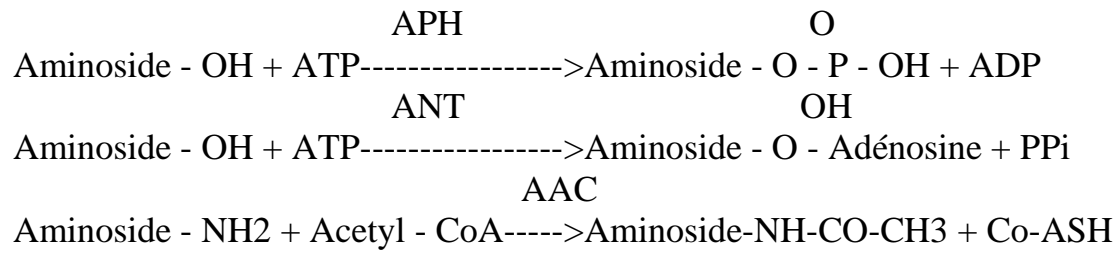


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

et carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



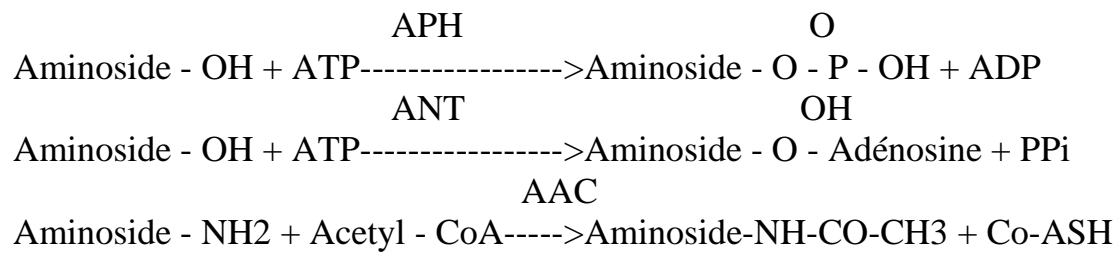


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

t carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

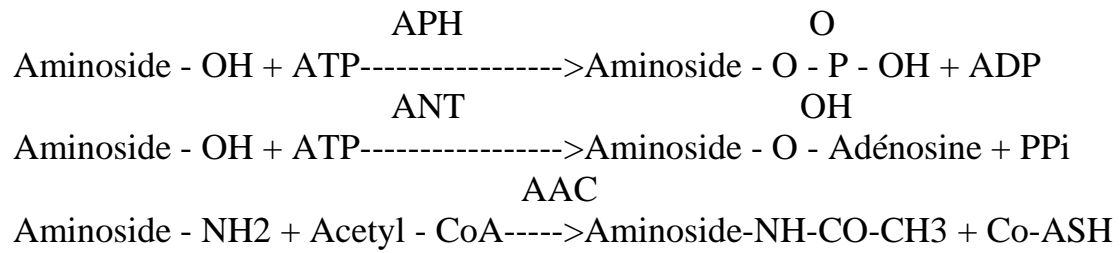


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

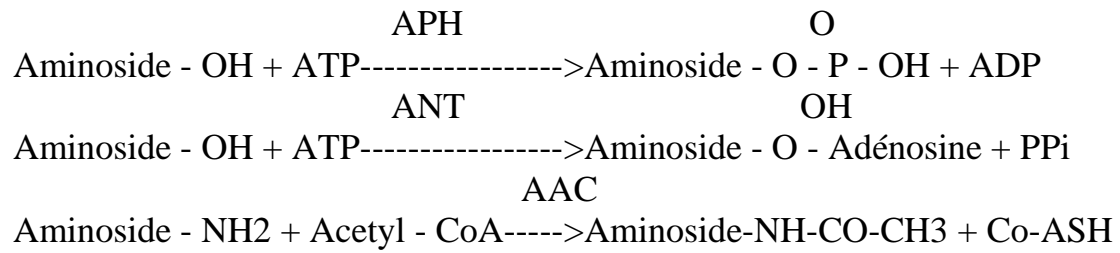


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

carboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

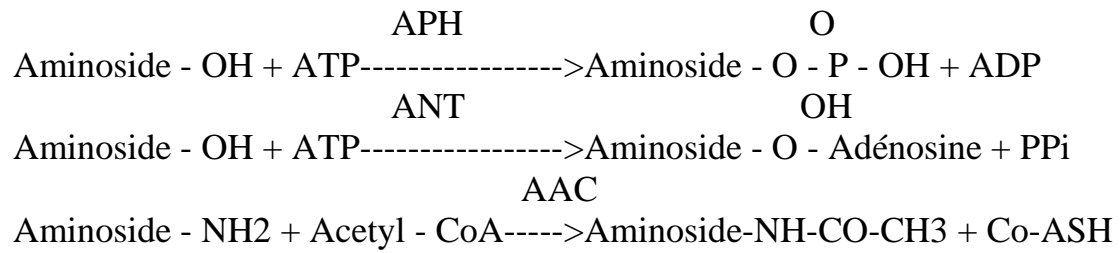


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Ampicilline,	
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

arboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

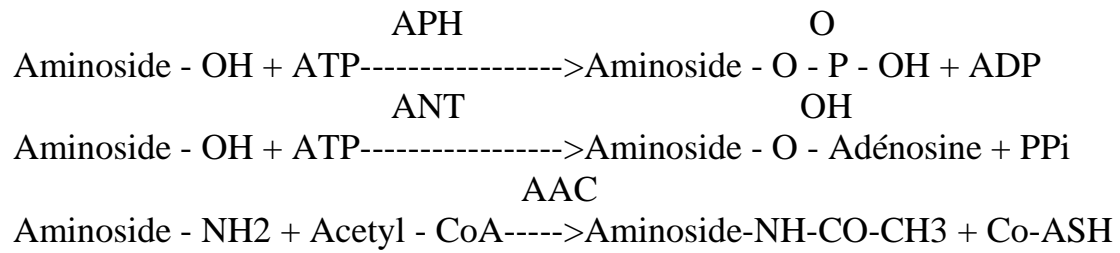


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide) ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :  
- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Ampicilline,	
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
S	
S	
S	
S	
S	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Pase haut niveau BSE Case haut
	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
R	R
R	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	R
R	R
R	S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
R	
S	
S	
R	
R	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam,
Aztreonam	S
S	S

R S

S Imipenem S S S

rboxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

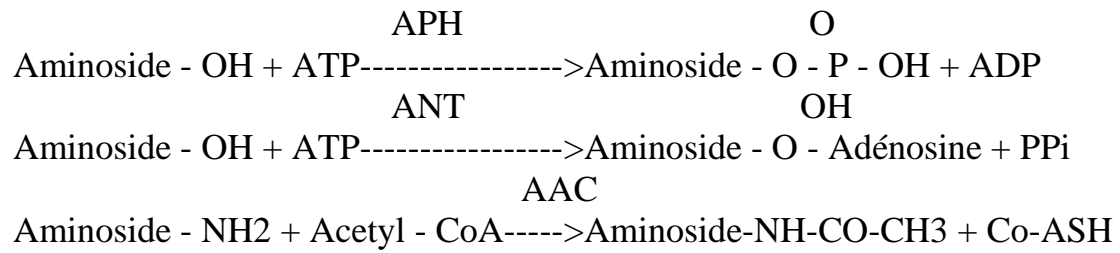


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Amoxicilline,	Ampicilline,
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

boxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

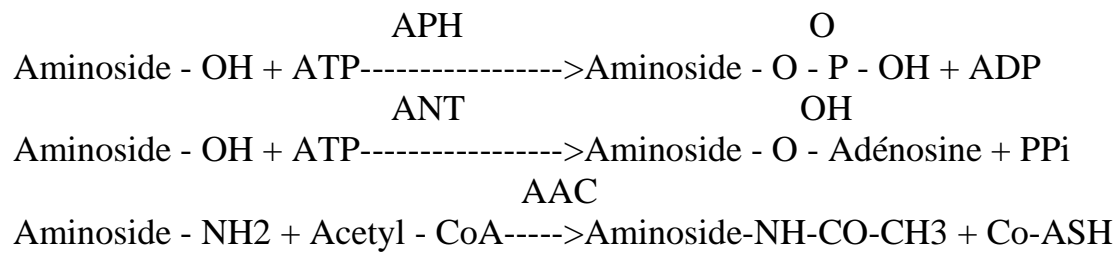


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

oxypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

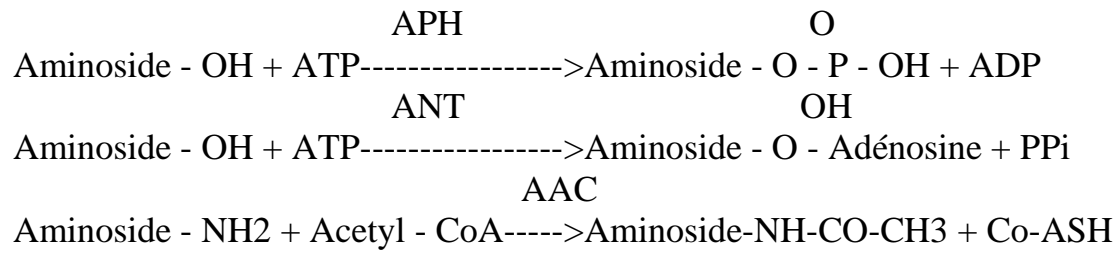


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

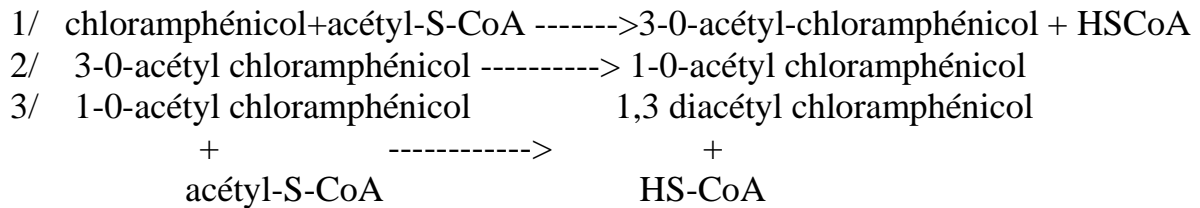
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

xypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



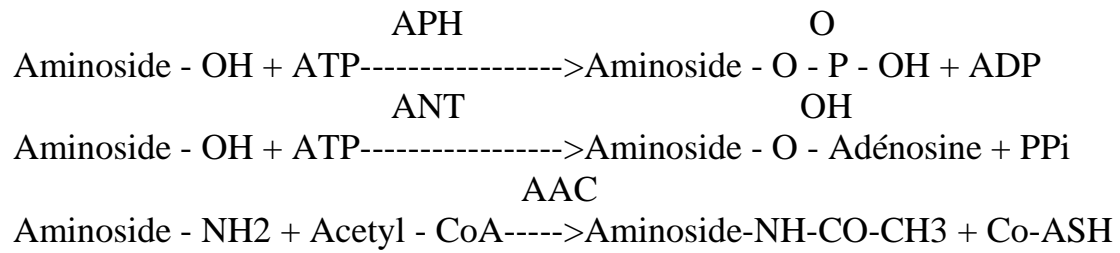


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ypeptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

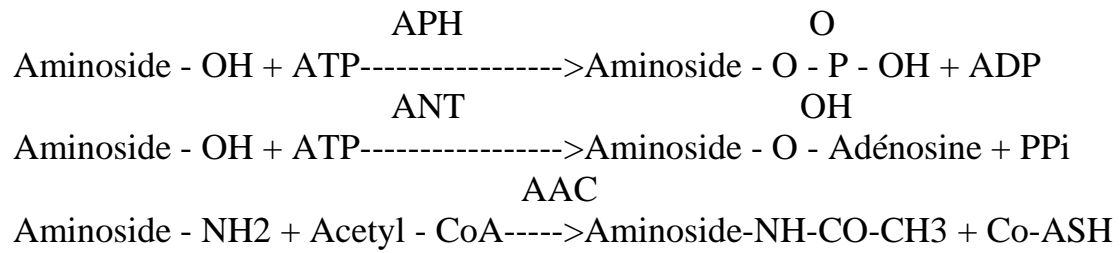
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

peptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistance bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

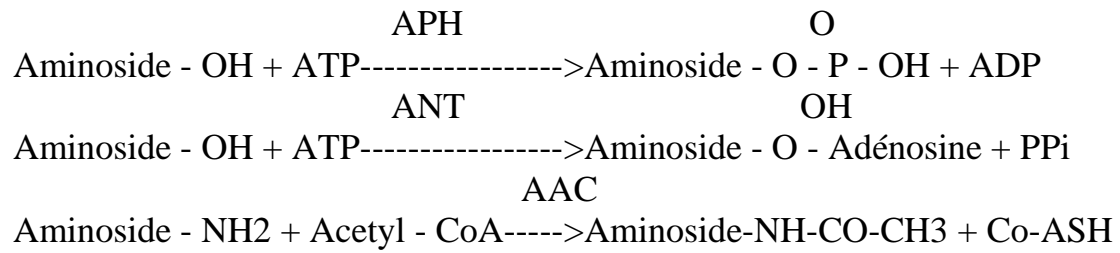


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

eptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

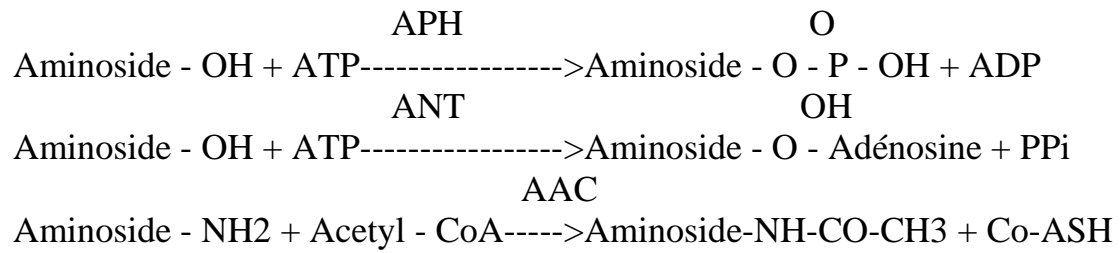
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

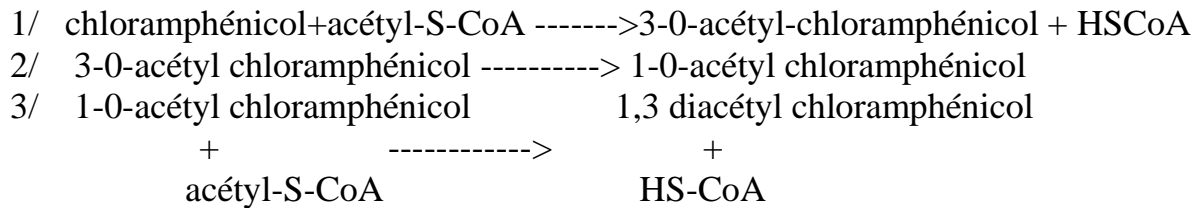
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ptidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

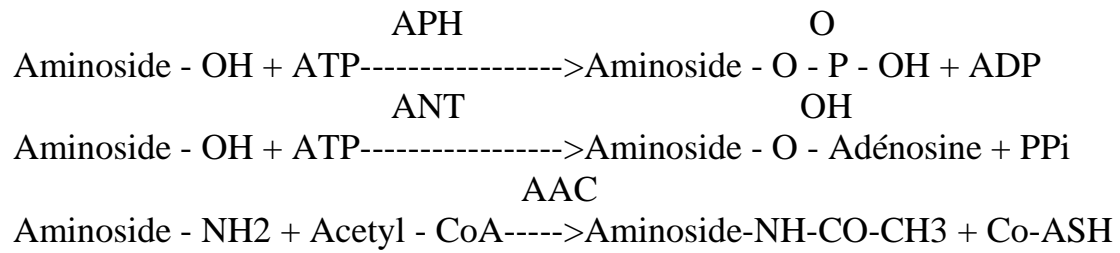
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

tidase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

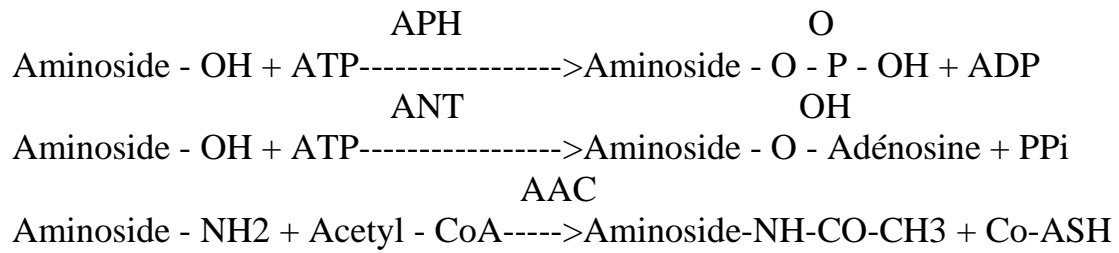


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

idase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

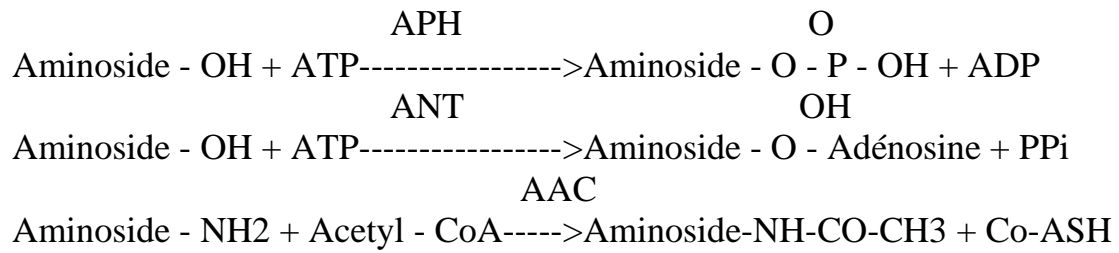


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

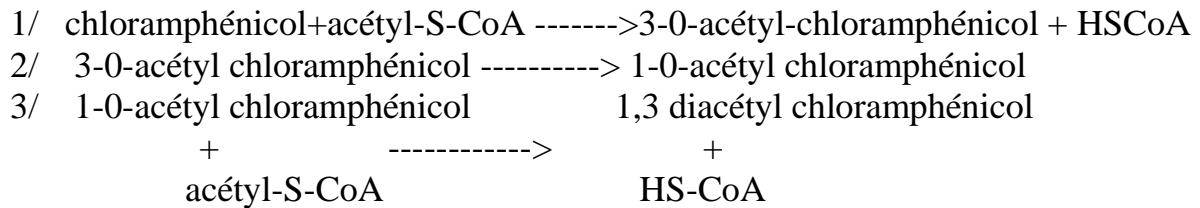
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

dase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

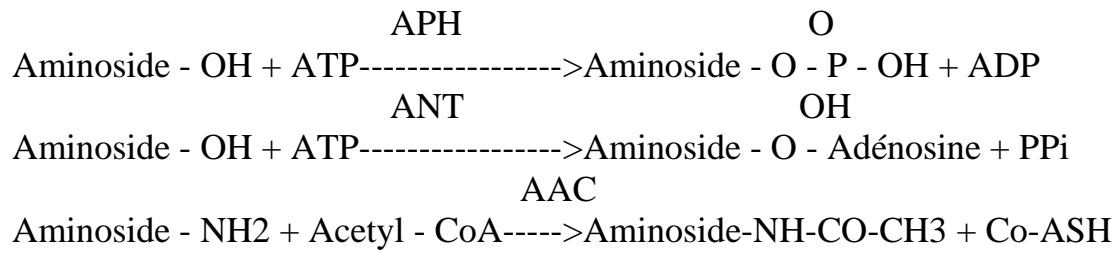
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ase) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



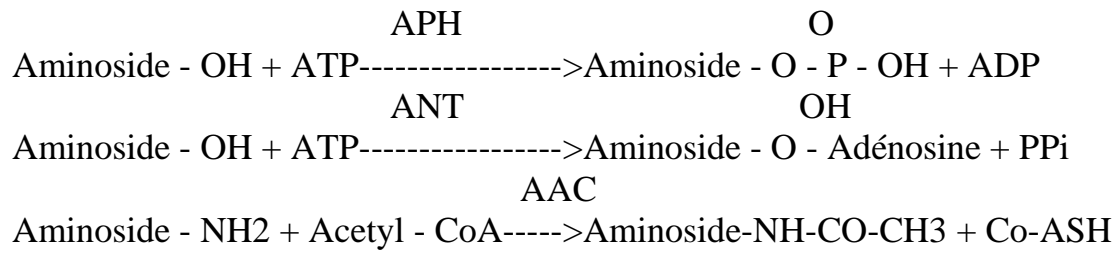


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i> <i>Klebsiella</i>	
<i>C. diversus</i> <i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

se) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

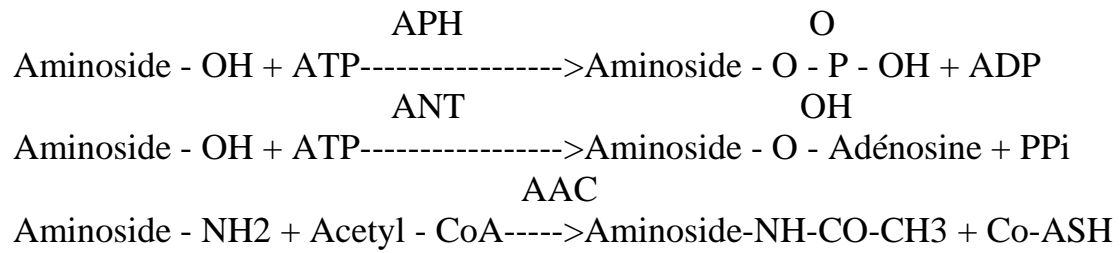


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

e) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

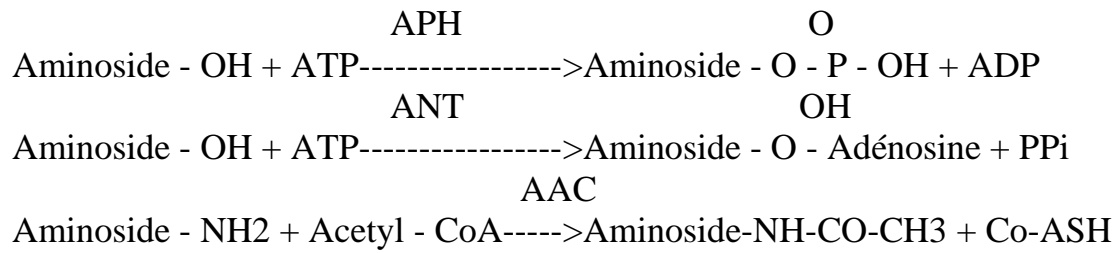


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

) essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

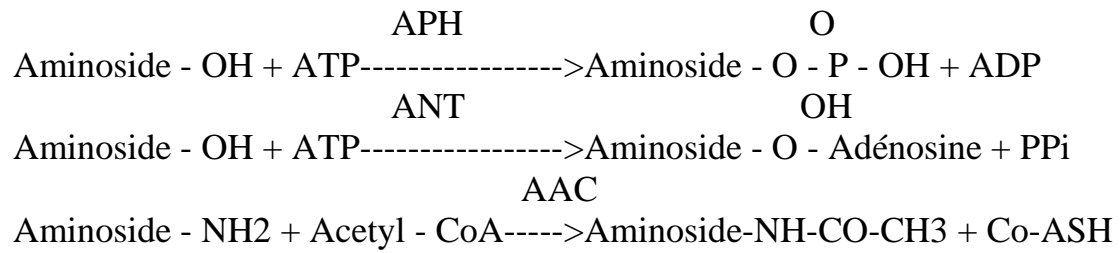


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>
Amoxicilline,	Ampicilline,
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Pase bas niveau Cse bas
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
	R R
	R S
S	Mécillinam R R S/R
	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
	S S

R S

S Imipenem S S S

essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

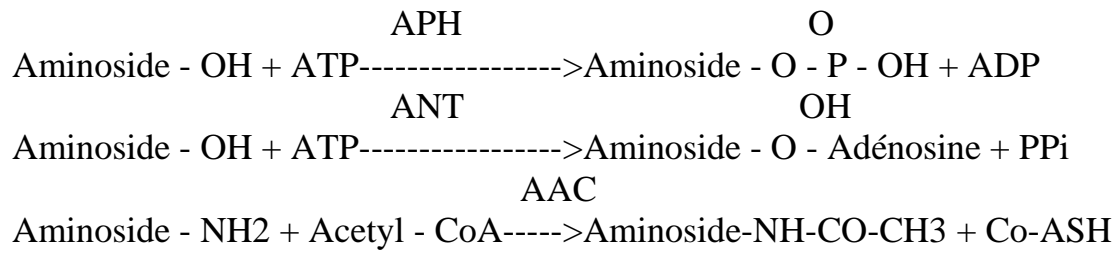
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

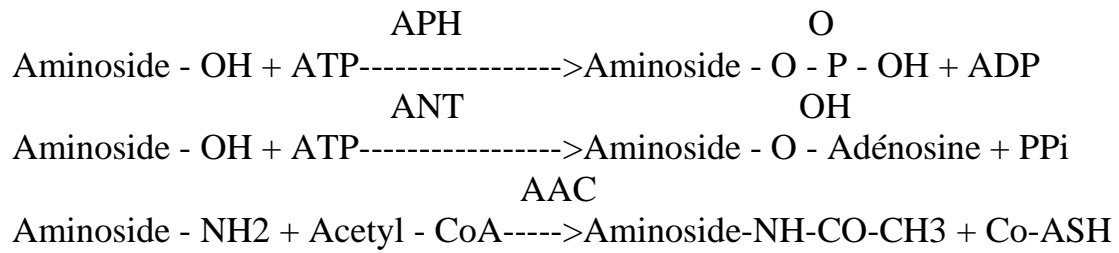


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

## 2-6-1- Résistance acquise

## + Modification de la cible

μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

## + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

## + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

essentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

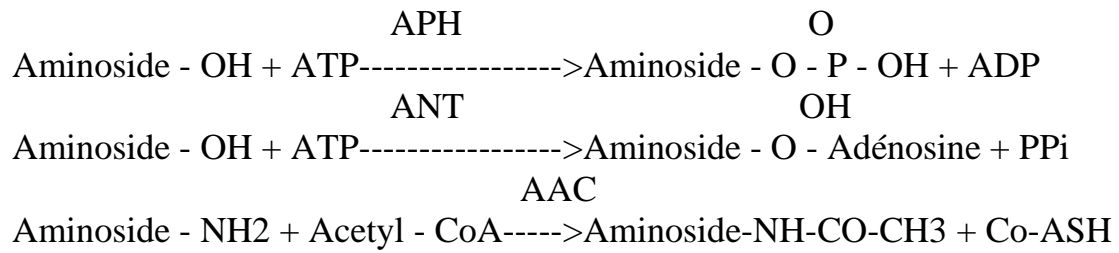
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux β-lactamines

## PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i> <i>P. mirabilis Klebsiella</i> <i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline, Amoxicilline, Amoxicilline + Ac. Clavulanique S R S R R Ticarcilline, Pipéracilline, Mezlocilline S R I S S Mécillinam S I Céfalosporines : Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan S S S S S S R S S/R Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S Pase bas niveau Cse bas niveau PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE Pase haut niveau BSE Case haut niveau Ampicilline, Amoxicilline, Amoxicilline + Ac. Clavulanique R R R R R R Ticarcilline, Pipéracilline, Mezlocilline R R R R S S Mécillinam R R S/R Céfalosporines : Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim Cephamicines : Céfoxitine, Cefotetan R S S R R S R S S/R Moxalactam, Aztreonam S S S
--	--

R S

S Imipenem S S S

sentielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

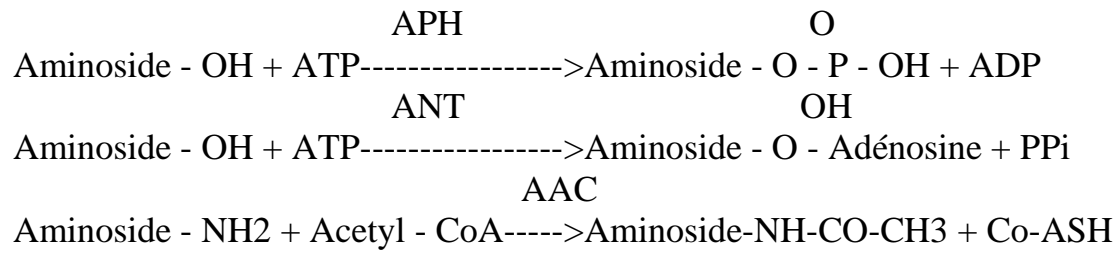
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

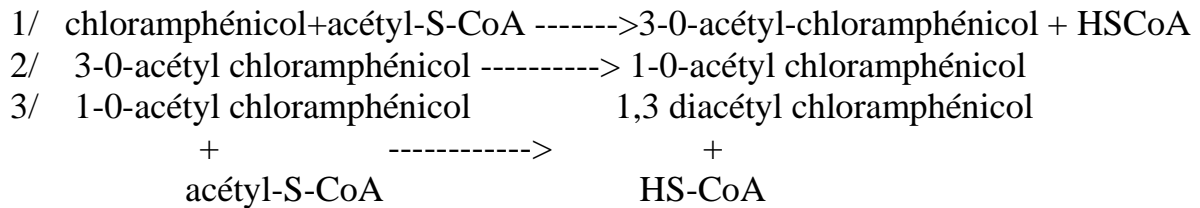
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

entielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2 ) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



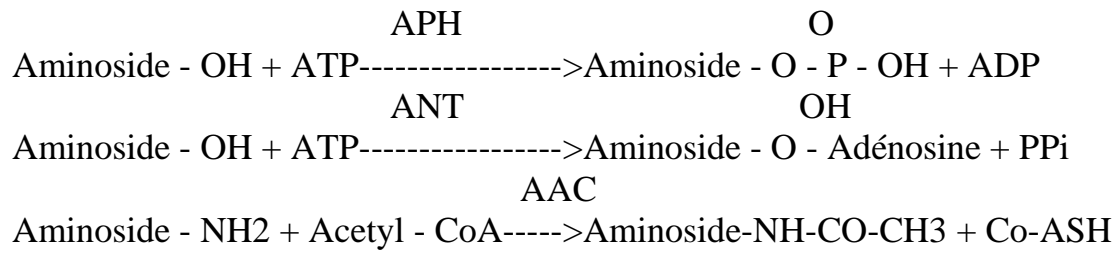


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

## 2-6-1- Résistance acquise

## + Modification de la cible

μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

## + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

## + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

ntielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

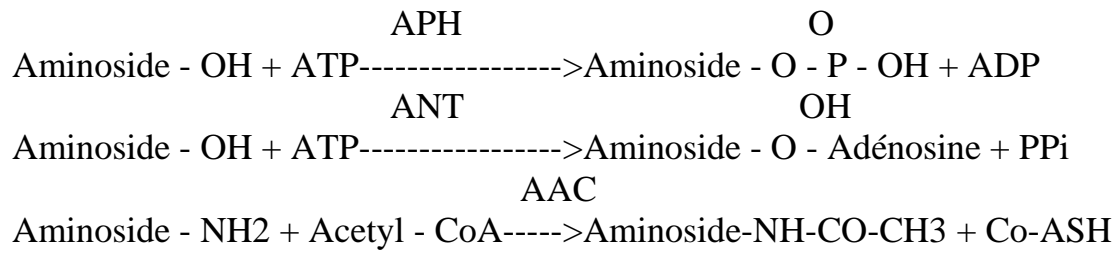
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

tielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

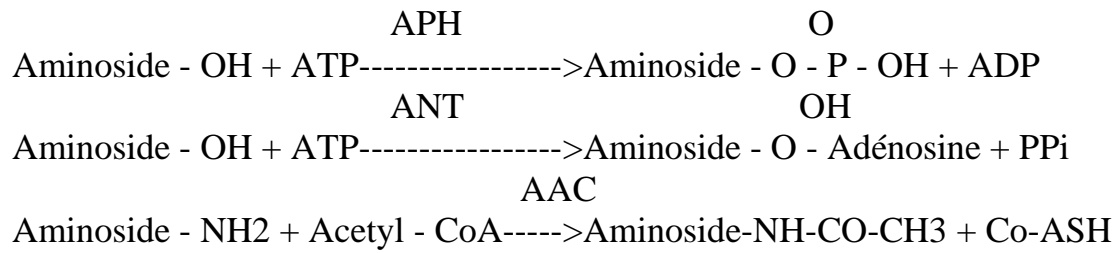


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

ielles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

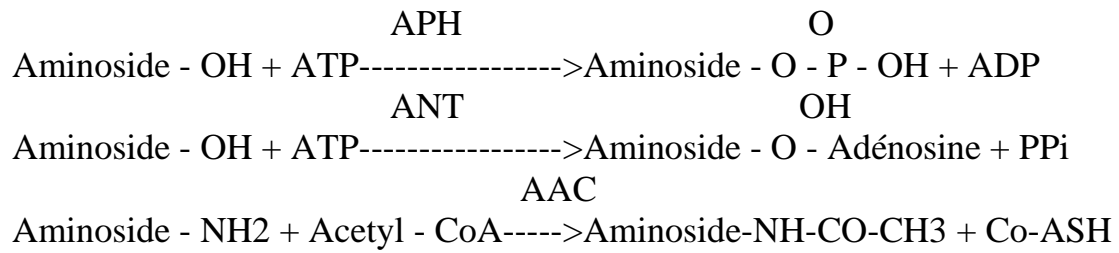


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

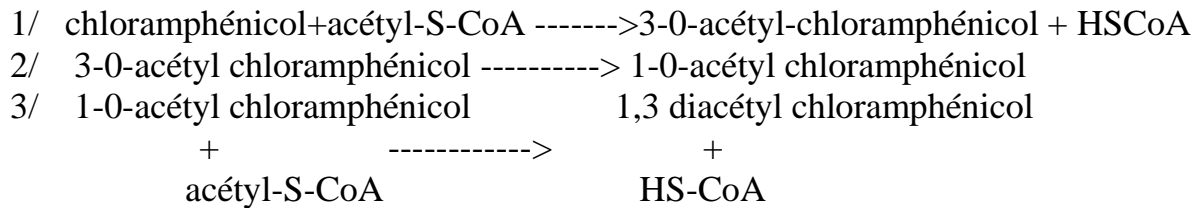
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthopriime).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthopriime (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthopriime, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques  
soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

elles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

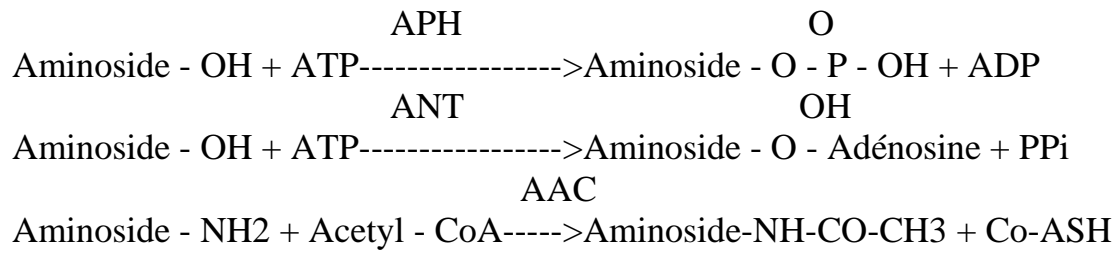
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

elles à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

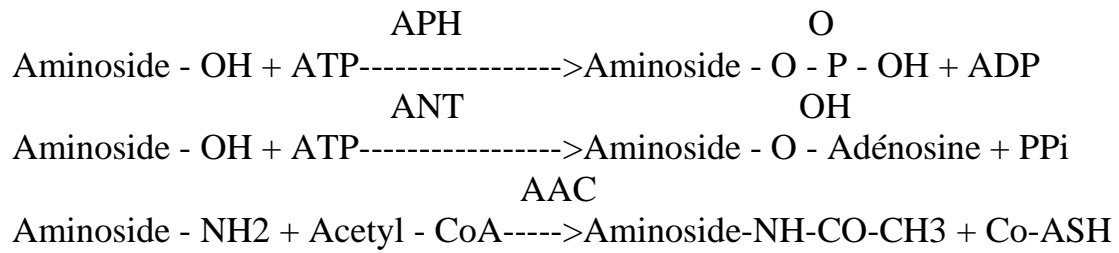
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.





R S

S Imipenem S S S

les à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*



- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

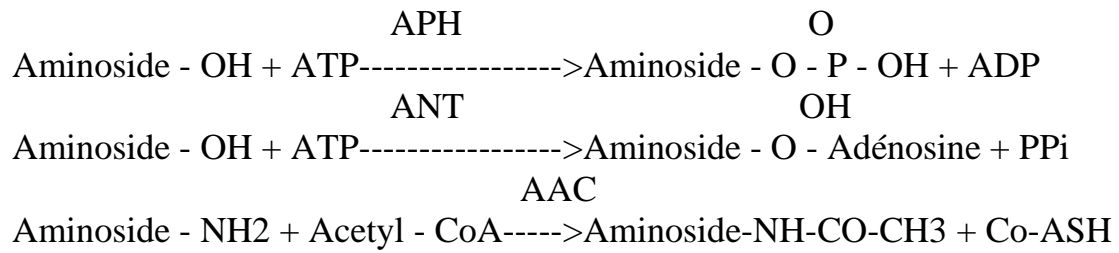


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

es à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

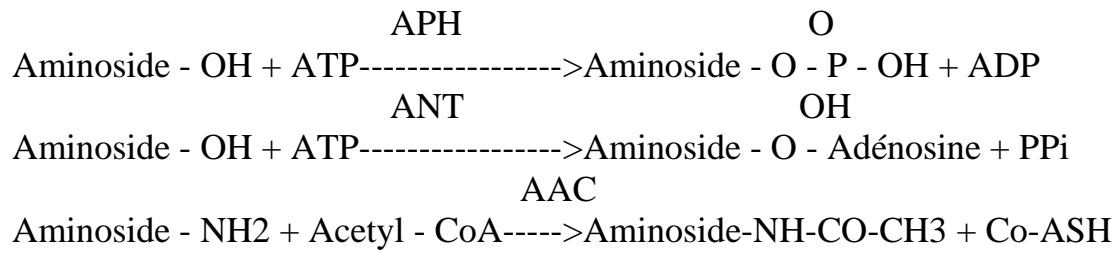


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

s à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

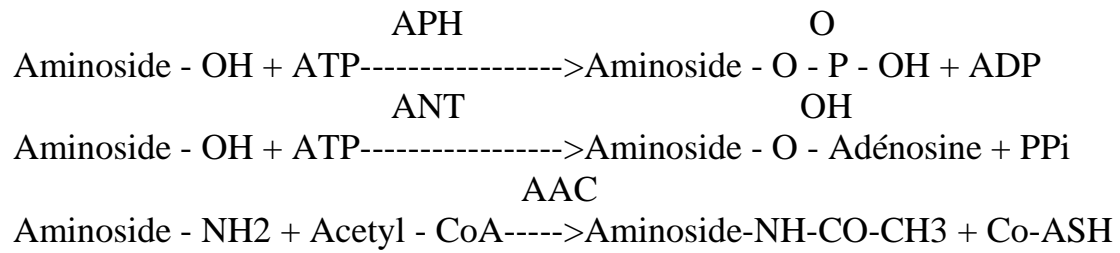
- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.





**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

## PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis</i> <i>Klebsiella</i>	
<i>C. diversus</i> <i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I <i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
S	
S	
S	
S	
S	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam, Aztreonam S S S Imipenem S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique R
R	R
R	R
R	Ticarcilline,
	Pipéracilline, Mezlocilline R
R	R
R	S
S	Mécillinam R R S/R <i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan
R	
S	
S	
R	
R	
S	
R	
S	
S/R	Moxalactam,
	Aztreonam S
S	S

R S

S Imipenem S S S

à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

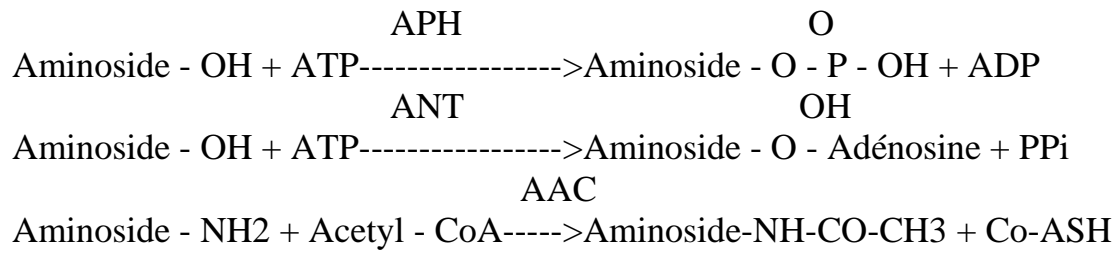


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :





TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

à la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D2) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

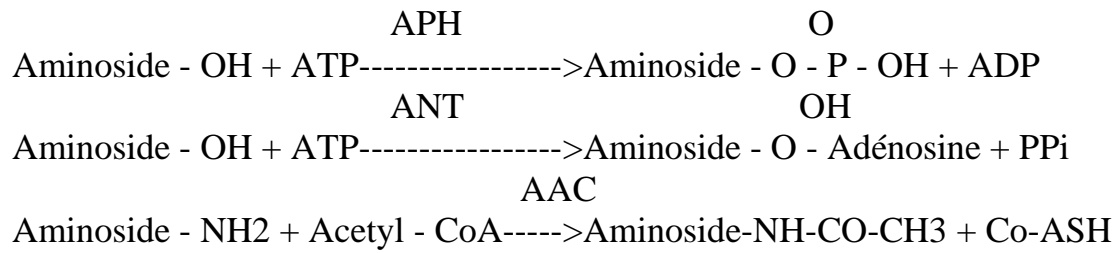


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

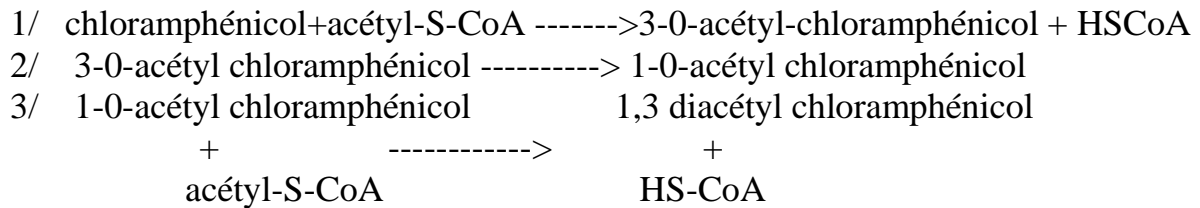
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

		PHENOTYPE SAUVAGE			
<i>E.coli,</i>					
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>				
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>				Ampicilline,
	Amoxicilline,				
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S	R		
		S	R		
	R Ticarcilline,				
	Pipéracilline, Mezlocilline	S			
		S	R		
		I	S		
	S Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>	
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone				
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim				
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan				
		S			
		S			
		S			
		S			
		S			
		S			
		R			
		S			
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Pase bas niveau Cse bas
	niveau PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE				Pase haut niveau BSE Case haut
	niveau Ampicilline, Amoxicilline,				
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R			
		R	R		
		R	R		
	R Ticarcilline,				
	Pipéracilline, Mezlocilline	R			
		R	R		
		R	S		
	S Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone				
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim				
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan				
		R			
		S			
		S			
		R			
		R			
		S			
		R			
		S			
	S/R Moxalactam,				
	Aztreonam	S			
		S	S		



R S

S Imipenem S S S

la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

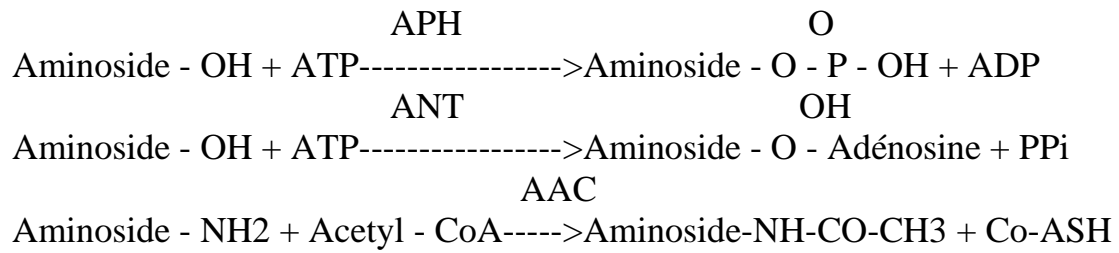
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

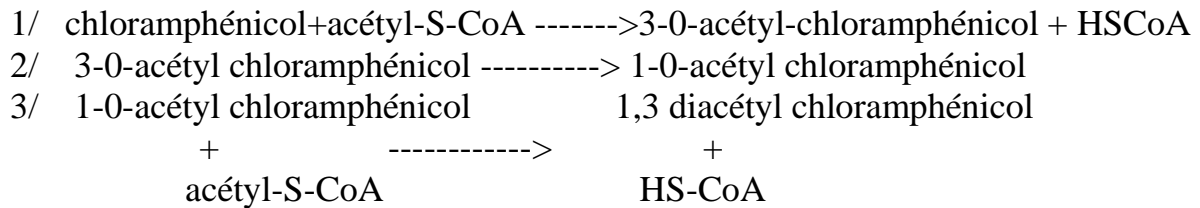
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bêtalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml
- indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

la synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

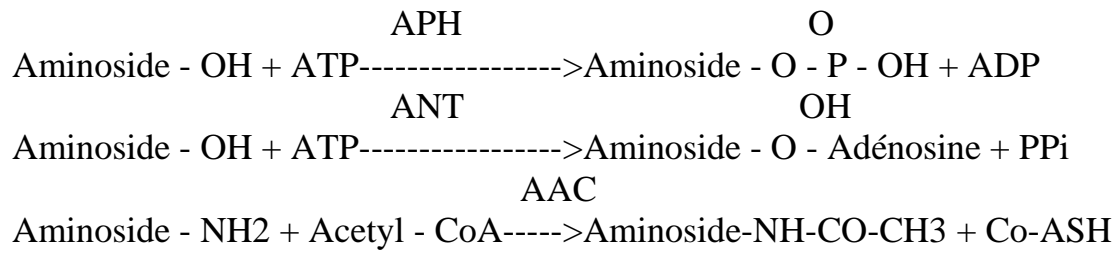


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

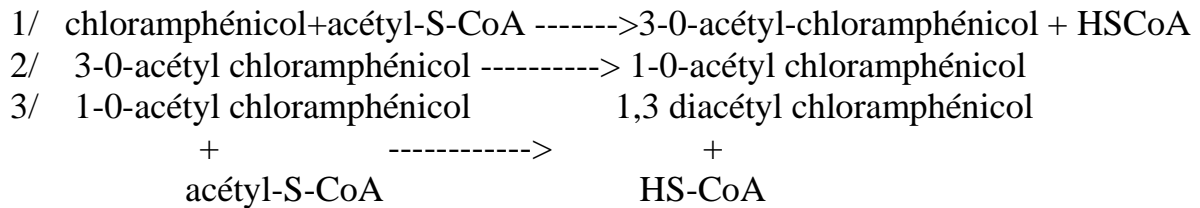
Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprim).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprim (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprim, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>										
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>									
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>								Ampicilline,	
	Amoxicilline,									
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
		S	R							
		S	R							
	R Ticarcilline,									
	Pipéracilline, Mezlocilline	S								
		S	R							
		I	S							
	S Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>						
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau	Cse bas
	niveau				PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE				Pase haut niveau	BSE Case haut
	niveau				Ampicilline, Amoxicilline,					
					Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R				
		R	R							
		R	R							
	R Ticarcilline,									
	Pipéracilline, Mezlocilline	R								
		R	R							
		R	S							
	S Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>					
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		R								
		S								
		S								
		R								
		R								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam,									
	Aztreonam	S								
		S	S							

R S

S Imipenem S S S

a synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céfsulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,



Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*  
*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

*species* Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

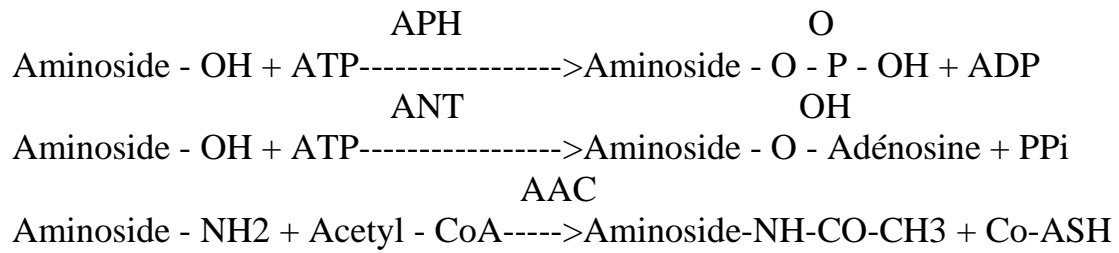


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.



Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

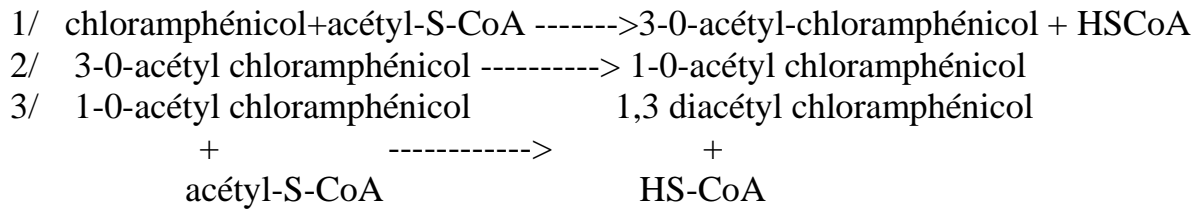
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (béta-lactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>	
<i>C. diversus Proteus,,Providencia,Enterobacter,Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
S	R
S	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
S	R
I	S
S	Mécillinam S I Céphalosporines :
Cefalotine,Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
<i>Cephamycines</i> : Céfoxitine,Cefotetan	
S	
S	
S	
S	
S	
S	
S	
R	
S	
S/R Moxalactam, Aztreonam	S S S Imipenem S S S Pase bas niveau Cse bas
niveau PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE	Pase haut niveau BSE Case haut
niveau Ampicilline, Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R
R	R
R	R
R	Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	R
R	R
R	S
S	Mécillinam R R S/R Céphalosporines :
Cefalotine,Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
<i>Cephamycines</i> : Céfoxitine,Cefotetan	
R	
S	
S	
R	
R	
S	
R	
S	
S/R Moxalactam,	
Aztreonam	S
S	S

R S

S Imipenem S S S

synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>



- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

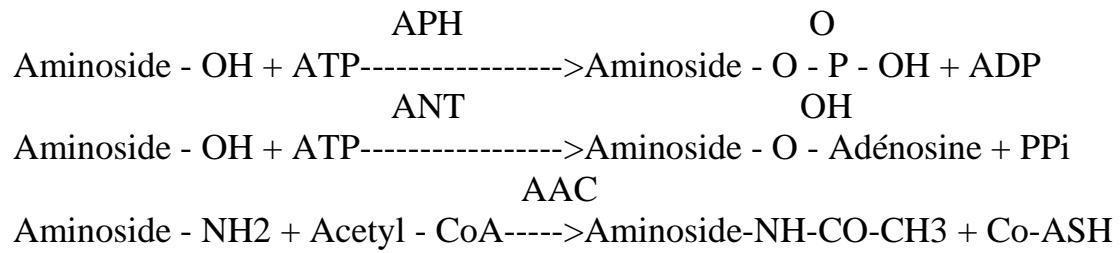


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

## 2-6-1- Résistance acquise

## + Modification de la cible

μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

## + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

## + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

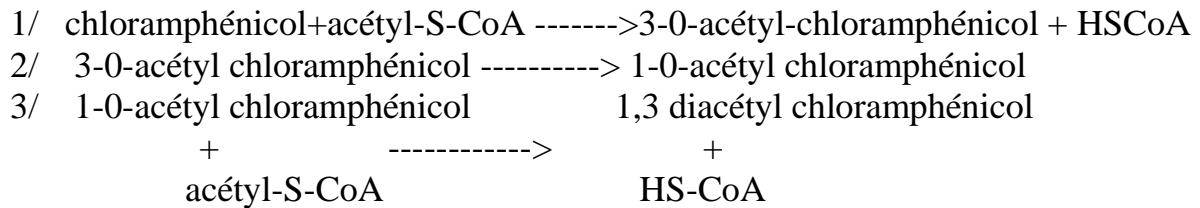
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthopriime).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthopriime (22, 26)

## 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthopriime, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

## 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)



### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

**PHENOTYPE SAUVAGE**

<i>E.coli,</i>	
<i>P. mirabilis Klebsiella</i>	
<i>C. diversus Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,
Amoxicilline,	
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S
	S R
	S R
	R Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	S
	S R
	I S
S Mécillinam	S I Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
<i>Cephamicines</i> : Céfoxitine, Cefotetan	
	S
	S
	S
	S
	S
	S
	R
	S
S/R Moxalactam, Aztreonam	S S S Imipenem S S S Pase bas niveau Cse bas
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE Pase haut niveau BSE Case haut
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R
	R R
	R R
	R Ticarcilline,
Pipéracilline, Mezlocilline	R
	R R
	R S
S Mécillinam	R R S/R Céphalosporines :
Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
<i>Cephamicines</i> : Céfoxitine, Cefotetan	
	R
	S
	S
	R
	R
	S
	R
	S
S/R Moxalactam,	
Aztreonam	S
	S S

R S

S Imipenem S S S

synthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécillinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE



Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

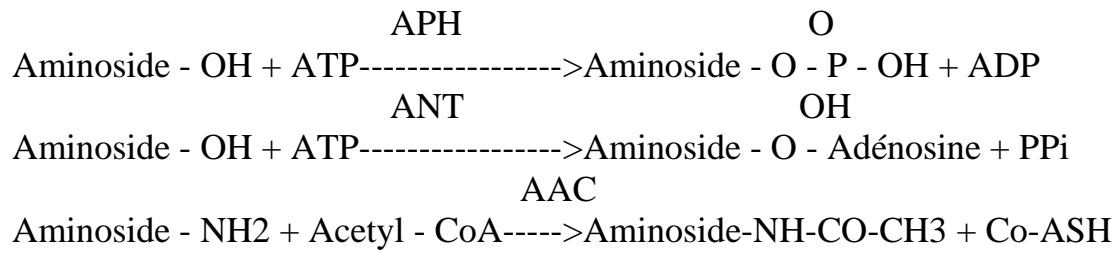
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.



### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

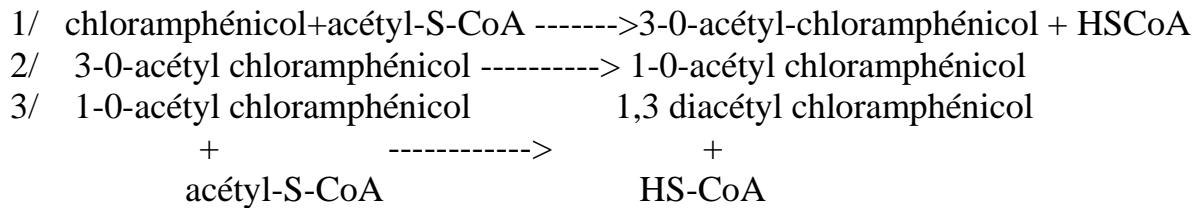
Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

**CAT**

Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimé).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimé (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimé, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritifensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche estensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

	PHENOTYPE SAUVAGE	
<i>E.coli</i> ,		
<i>P. mirabilis</i> <i>Klebsiella</i>		
<i>C. diversus</i> <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Morganella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Serratia</i>	Ampicilline,	
Amoxicilline,		
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S	
S	R	
S	R	
R	Ticarcilline,	
Pipéracilline, Mezlocilline	S	
S	R	
I	S	
S	Mécillinam	S I
	<i>Céphalosporines</i> :	
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
	<i>Cephamycines</i> : Céfoxitine, Cefotetan	
	S	
	S	
	S	
	S	
	S	
	S	
	R	
	S	
S/R	Moxalactam, Aztreonam	S S S
niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE	Imipenem S S S
niveau	Ampicilline, Amoxicilline,	Pase bas niveau Cse bas
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	Pase haut niveau BSE Case haut
R	R	
R	R	
R	Ticarcilline,	
	Pipéracilline, Mezlocilline	R
R	R	
R	S	
S	Mécillinam	R R S/R
	<i>Céphalosporines</i> :	
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone	
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim	
	<i>Cephamycines</i> : Céfoxitine, Cefotetan	
	R	
	S	
	S	
	R	
	R	
	S	
	R	
	S	
S/R	Moxalactam,	
	Aztreonam	S
S	S	

R S

S Imipenem S S S

ynthèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.



#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique(28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime.(81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



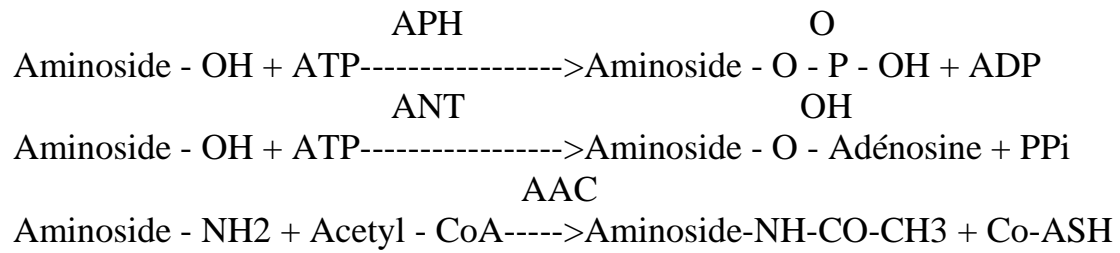


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

## 2-6-1- Résistance acquise

## + Modification de la cible

μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

## + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

## + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

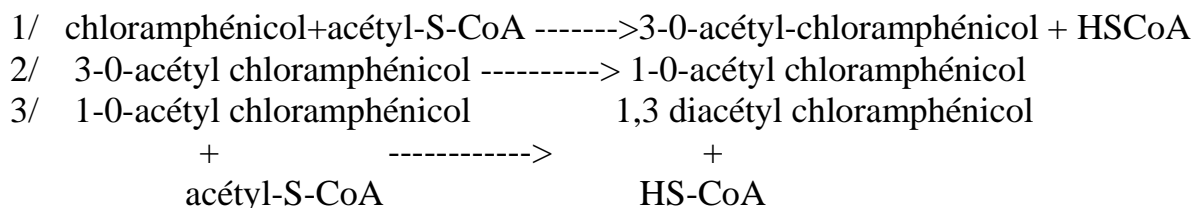
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.

TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorigènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32



mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

## PHENOTYPE SAUVAGE

<i>E.coli,</i>										
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>									
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>								Ampicilline,	
	Amoxicilline,									
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S								
		S	R							
		S	R							
	R Ticarcilline,									
	Pipéracilline, Mezlocilline	S								
		S	R							
		I	S							
	S Mécillinam	S	I	<i>Céphalosporines :</i>						
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S	Imipenem	S	S	S	Pase bas niveau	Cse bas
	niveau				PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE				Pase haut niveau	BSE Case haut
	niveau				Ampicilline, Amoxicilline,					
					Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R				
		R	R							
		R	R							
		R			R Ticarcilline,					
		R			Pipéracilline, Mezlocilline	R				
		R	R							
		R	S							
	S Mécillinam	R	R	S/R	<i>Céphalosporines :</i>					
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone									
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim									
	<i>Cephamicines :</i> Céfoxitine, Cefotetan									
		R								
		S								
		S								
		R								
		R								
		S								
		R								
		S								
	S/R Moxalactam,									
	Aztreonam	S								
		S	S							

R S

S Imipenem S S S

ntèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries ( Klebsiella,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).



La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque* Modification du LPS - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance a été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaido ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

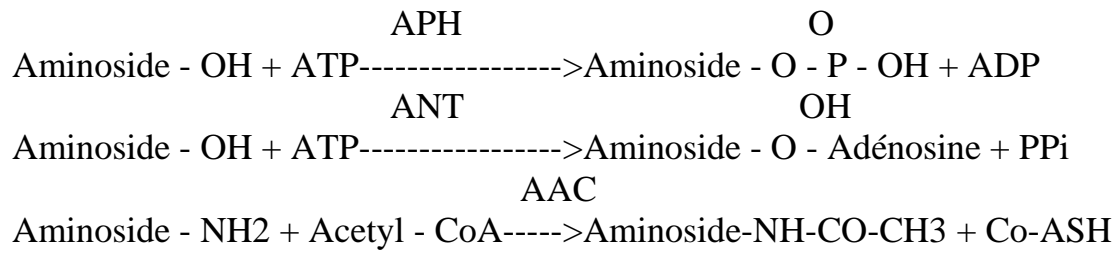


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

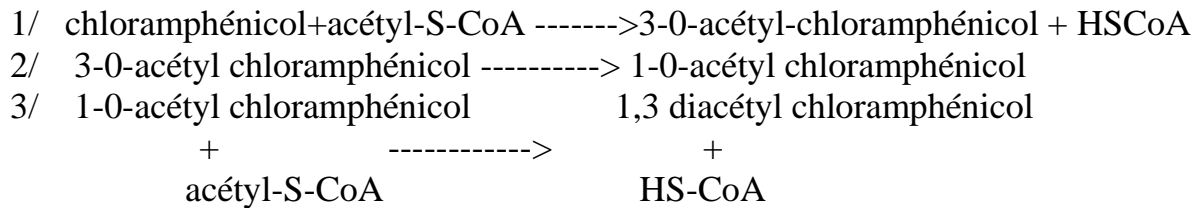
Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :

## CAT



Outre la résistance plasmidique par inactivation, un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi, entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et triméthoprimine).

## 2-10- Résistance vis à vis des sulfamides et du triméthoprimine (22, 26)

### 2-10-1- Résistance naturelle :

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000 mg/l cette résistance concerne toutes les espèces, en particulier, les entérobactéries.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprimine, pourrait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques. Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2 mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 1000 mg/l, sont dites souches résistantes de haut niveau.

### 2-10-2- Résistance acquise :

Il s'agit :

soit de mutations chromosomiques

soit d'une résistance codée par des plasmides.



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

thèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (*Serratia*, *Entérobacter*, *Morganella*) et chez les *Pseudomonas*.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,



PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases

Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle
Entérocoques	Acquisition d'une nouvelle PLP
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multiplés modifications
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe	-
Entérobactéries ( <i>Escherichia coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> )	
- <i>Pseudomonas</i>	
- <i>Haemophilus</i>	
- <i>Gonocoque</i>	Modification des PLP
- <i>Pseudomonas</i>	- <i>Escherichia coli</i>

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des

Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

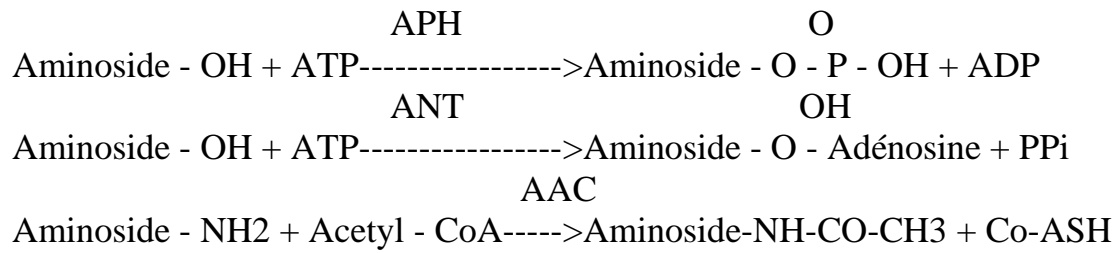
La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.



**Figure 11** : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.



## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.

Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^\circ\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.

Tableau VI' : Phénotypes sauvages et phénotypes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines

		PHENOTYPE SAUVAGE				
<i>E.coli,</i>						
<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella</i>					
<i>C. diversus</i>	<i>Proteus, Providencia, Enterobacter, Morganella, Citrobacter, Serratia</i>	Ampicilline,				
	Amoxicilline,					
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	S				
		S	R			
		S	R			
	R Ticarcilline,					
	Pipéracilline, Mezlocilline	S				
		S	R			
		I	S			
	S Mécillinam	S	I			
	<i>Céphalosporines :</i>					
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone					
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim					
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan					
		S				
		S				
		S				
		S				
		S				
		S				
		R				
		S				
	S/R Moxalactam, Aztreonam	S	S	S		
	niveau	PHENOTYPES DE RESISTANCE ACQUISE		Pase bas niveau	Cse bas	
	niveau			Pase haut niveau	BSE	Case haut
	Amoxicilline, Amoxicilline,					
	Amoxicilline + Ac. Clavulanique	R				
		R	R			
		R	R			
	R Ticarcilline,					
	Pipéracilline, Mezlocilline	R				
		R	R			
		R	S			
	S Mécillinam	R	R	S/R		
	<i>Céphalosporines :</i>					
	Cefalotine, Cefamandole, Cefopérazone					
	Ceftriaxone, Céfotaxime, ceftazidim					
	<i>Cephamycines :</i> Céfoxitine, Cefotetan					
		R				
		S				
		S				
		R				
		R				
		S				
		R				
		S				
	S/R Moxalactam,					
	Aztreonam	S				
		S	S			



R S

S Imipenem S S S

hèse du péptidoglycane.

La résistance acquise des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique
- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame.
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique.

La fréquence de ces mécanismes de résistance est différente (10) (Tableau I).

#### 2.4.1. Résistance par production d'enzymes (5, 8, 9, 20, 15, 70, 73)

La production d'enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines demeure le mécanisme de résistance le plus largement distribué parmi les nombreuses espèces bactériennes.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être à l'origine de l'inactivation de ces antibiotiques. La production de  $\beta$ -lactamases s'est observée chez presque toutes les espèces bactériennes.

#### 2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation du cycle  $\beta$ -lactame.

La découverte, dès 1940 d'extraits bruts de bacilles à Gram négatif (*Escherichia. coli*) inactivant la benzylpénicilline montra l'existence d'un mécanisme de résistance par synthèse de "pénicillinase".

Le terme  $\beta$ -lactamase n'a été proposé qu'en 1960.

La pénicillinase de *Staphylococcus aureus* sera mise en évidence dès 1944, après, l'émergence de la résistance enzymatique ne devrait plus s'arrêter.

La diversité des  $\beta$ -lactamases oblige à une identification de plus en plus précise permettant une meilleure classification.

Plusieurs classifications des  $\beta$ -lactamases ont été proposées (8, 16, 61) selon leurs propriétés physico-chimiques, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmide ou chromosome), leur hôtes habituels, la séquence nucléotidique de leurs gènes ou leurs compositions en acides aminés, leurs localisations bactériennes (exocellulaires ou périplasmiques), leurs affinités pour différents substrats ( $\beta$ -lactamines). La classification la plus utilisée est celle de RICHMOND et SYKES ( tableau II ) (12).

Le tableau III reproduit une classification simple d'utilisation pratique.

Schématiquement les  $\beta$ -lactamines peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases.

- Les pénicillinases.

Elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines. Une faible action peut être observée avec les céphalosporines de première génération.

Les gènes codant pour les pénicillines sont portés essentiellement par les plasmides. Cependant on retrouve chez *K. pneumoniae* une enzyme type pénicillinase : SHV-1 dont le support génétique est le chromosome.

Ces pénicillinases sont fabriquées en permanence par la bactérie en l'absence de tout inducteur (constitutives) sauf celle de *S. aureus*.

Il existe une très grande variété de pénicillinases : TEM, SHV, OXA, PSE. Elles peuvent être spécifiques à un genre (pénicillinases de *S. aureus*) ou largement distribuées.

L'enzyme de type TEM est retrouvée chez les entérobactéries, les Haemophilus, les Neisseria, les Pasterella, les Pseudomonas. Elle inactive les aminopénicillines, les carboxypénicillines, les ureïdopénicillines, et les premières céphalosporines.

*Pseudomonas aeruginosa* produit les enzymes de type CARB, OXA, TEM qui n'hydrolysent pas la céftazidime, l'imipénème, et le céfepime, contrairement aux pénicillines, à la céfopérazone et à la céf sulodine

Depuis 1983 des  $\beta$ -lactamases ayant un spectre très large sont apparues (36, 79) : ce sont les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BSE).

Elles inactivent entre autre les céphalosporines de type oxyimino. La plupart de ces enzymes sont des mutants de TEM ou SHV (avec des substitutions d'acides aminés proches du site enzymatique, ce qui entraîne une affinité et une hydrolyse augmentée propre aux  $\beta$ -lactamines utilisées actuellement à l'hôpital (75).

Ces  $\beta$ -lactamases sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*,

Escherichia, Salmonella, Serratia) ( 64, 73 ).

Récemment sont apparues :

des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi non dérivées de TEM ou de SHV, telles MEN-1, BIL-1, FEC-1.

de nouvelles et rares enzymes telles que carbapénémases ou  $\beta$ -lactamases TRI (TEM Résistant Inhibitor).

Elles sont généralement chromosomiques et spécifiques d'une espèce (48, 44). Parfois présentes mais non exprimées, comme chez *E. coli*, elles peuvent s'exprimer à bas niveau ou haut niveau conduisant à des phénotypes de résistance très hétérogènes.

Le phénotype "céphalosporinases bas niveau" correspond généralement au phénotype sauvage de l'espèce.

Le phénotype "céphalosporinases haut niveau" correspond aux souches sécrétant des enzymes qui hydrolysent les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipéném et du mécilinam.

On retrouve ce phénotype essentiellement chez certaines *entérobactéries* (Serratia, Entérobacter, Morganella) et chez les Pseudomonas.

Pour que la bactérie puisse produire des  $\beta$ -lactamases inductibles il faut qu'elle soit en présence d'un inducteur, qui est très souvent une  $\beta$ -lactamine (45). Il existe cependant des inducteurs non spécifiques, qui ne sont pas des  $\beta$ -lactamines ( acides aminés, certains alcools, vitamines, ect...) (23).

Les céphalosporinases inductibles sont rencontrées habituellement chez certaines Entérobactéries, telles que *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter*, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*.

L'autre moyen pour produire plus d'enzymes serait la sélection de mutants. La mutation se traduit par la production constitutive d'une quantité 100 à 5000 fois plus importante que le phénotype "céphalosporinase bas niveau".

Tableau I : Mécanismes de résistance acquise des bactéries aux (-lactamines  
Mécanismes Bactéries à Gram Positif Bactéries à Gram négatif Production  
d'une

(-lactamase + +++ Imperméabilité de la paroi - ++ Modification des  
PLP +++ +

Tableau II : Classification de RICHMOND ET SYKES des (-lactamases des  
bactéries à Gram négatif

Médiation Type Classe Inductibilité Activité référentielle  
Péni CSP Inhibée par

Cloxa PCMB Principaux germes Chr Case Ia I -

+++ S R Entérobacter Citrobacter Chr Case Ib C - + S R E.

*coli* Chr Case Ic I - ++ S R *Proteus vulgaris* Chr Case Id I -

+ S R *Pseudomonas aeruginosa* Chr Pase II C ++ - S R *Proteus*

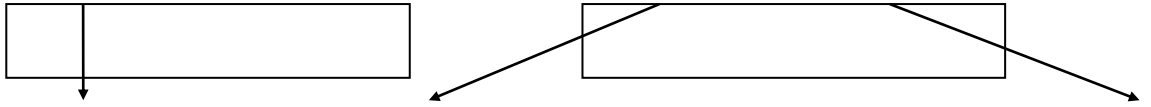
*mirabilis* Pl Case III C +++ + S R Médiation plasmidique type

TEM Chr Case IV C + + R S *Klebsiella*

species Pl Pase V C ++ - R S Médiation plasmidique type OXA,

PSE

Tableau III : Classification des (-lactamases



Ont été décrites comme mutants dérégulés des espèces telles que : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *Serratia* sp, *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Des céphalosporinases à spectre élargi sont actuellement décrites. Ce sont les céphamycinases : CMY-1, CMY-2, MIR-1, BIL-1, MOX-1. Il s'agit de  $\beta$ -lactamases initialement chromosomiques chez *E. cloacae*, *C. freundii*.

Selon l'enzyme intervenant et la souche, l'expression de la résistance sera variable.

#### 2.4.1.2. Les Estérases

Ces enzymes coupent la chaîne latérale des céphalosporines les rendant inactifs.

#### 2.4.1.3. Les Amidases

Elles hydrolysent la chaîne latérale des  $\beta$ -lactamines et libèrent l'acide Amino-7-céphalosporanique dans le cas des céphalosporines et l'acide Amino-6-pénicillanique dans le cas des pénicillines.

#### 2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance non enzymatiques aux  $\beta$ -lactamines s'opposent aux mécanismes de résistance enzymatiques liées à la production de  $\beta$ -lactamases. Ils sont différents chez les bactéries à Gram positif ou négatif.

##### 2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique (28).

Plusieurs PLP sont présentes dans chaque espèce et parmi celles-ci, il existe généralement une PLP dite "essentielle", dont l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines est corrélée à la CMI (35).

Plusieurs types de modifications peuvent être rencontrés (Tableau IV).

- La diminution de l'affinité de la PLP essentielle pour les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce cas l'affinité est diminuée pour toutes les  $\beta$ -lactamines mais de manière inégale selon les molécules. Une telle modification a été démontrée avec la PLP-1 de *Clostridium perfringens*, modification qui s'accompagne d'une augmentation d'un facteur 100 de la CMI pour la pénicilline et d'un facteur 10.000 pour la céfotaxime. (81)

- L'augmentation de la quantité de PLP

Ce mécanisme a été bien étudié chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP-5, présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente quantitativement d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

- Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle. C'est le cas de *S. aureus* résistante à la méthicilline (28, 34).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines.

#### 2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif (Tableau V)

La structure particulière des bactéries à Gram négatif leur confère un ensemble de mécanismes biochimiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines qu'on peut ne pas trouver chez les bactéries à Gram positif

##### 2.4.2.2.1. Rôle de la perméabilité dans la résistance des bactéries Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

Contrairement aux bactéries à Gram positif où les péptidoglycanes ne représentent pas une barrière pour la diffusion des  $\beta$ -lactamines, il existe au dessus du péptidoglycane une barrière de diffusion liée à la présence de la membrane externe (58).

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau.

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles. C'est chez *E. coli* que la relation entre les porines et les  $\beta$ -lactamines a été le mieux étudié (41). Deux types de porines sont présentes chez *E. coli* OmpC et OmpF. Chez les mutants OmpC<sup>-</sup>, la pénétration des  $\beta$ -lactamines n'est pas diminuée car le diamètre de la porine OmpF est suffisamment large. Au contraire l'absence de OmpF s'accompagne d'une résistance à la céfoxitine (4 x la CMI) sans modification de la CMI pour la céfaloridine.

#### Tableau IV : Résistances liées à des modifications de PLP chez des bactéries à Gram positif

Espèce	Diminution d'affinité pour les $\beta$ -lactamines	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Entérocoques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acquisition d'une nouvelle PLP	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Multiplés modifications	

#### Tableau V : Mécanismes de résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif

Modification de porines ou de protéines de la membrane externe -  
 Entérobactéries ( *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Serratia* )  
 - *Pseudomonas*  
 - *Haemophilus*  
 - *Gonocoque*      Modification des PLP - *Escherichia coli*  
 - *Pseudomonas*

- *Haemophilus*

- *Gonocoque*    Modification du LPS    - *Pseudomonas*

Ces résultats témoignent d'un passage préférentiel des  $\beta$ -lactamines à travers la porine OmpF car plus large. Quant aux mutants OmpC<sup>-</sup> OmpF<sup>-</sup>, leur CMI est augmentée d'une manière très importante.

Des résultats variables ont été obtenues pour les céphalosporines de troisième génération (66) avec généralement une faible augmentation plus marquée pour le moxalactam (10 - 100 X la CMI)

Ce mécanisme de résistance à été rapporté dans d'autres espèces : les Salmonelles, les Klebsielles, les Serratia et les Enterobacter (31, 33, 58, 66, 72, 74).

Trias et Nikaïdo ont montré l'existence chez les *Pseudomonas* d'une porine (porine D<sub>2</sub>) responsable du transport spécifique des carbapénèmes et dont l'absence ou la fermeture explique la résistance isolée à l'imipéném non croisée aux autres  $\beta$ -lactamines ou aux autres antibiotiques hydrophiles.

#### 2.4.2.2.2.- Rôle des PLP dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines

L'efficacité des  $\beta$ -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.

L'altération des PLP n'a été que rarement démontrée chez les bactéries à Gram négatif (21, 47, 74)

Le rôle des PBP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *Escherichia coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinam et à l'imipéném due à une diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnait d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (74).

#### 2-4-2 2-3 Autres mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### - Altération du LPS

La modification de la composition du LPS soit dans le polysaccharide soit dans le core semble être un des mécanismes possibles et fréquents de la résistance non enzymatique des *Pseudomonas* aux  $\beta$ -lactamines(38).

##### - Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis-à-vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste alors que l'effet bactéricide de l'antibiotique a disparu. L'absence d'activation du système lytique normalement activé par l'antibiotique explique ce phénomène.

Ce phénomène est surtout marqué pour les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des



Streptocoques.

- Persistence bactérienne

On observe une persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Ceci s'explique par une perte ou une diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène avec comme conséquence une modification du métabolisme bactérien. Ce phénomène a été observé avec les  $\beta$ -lactamines mais également avec les autres antibiotiques

2-5- Résistance aux aminosides (7, 22, 30)

2-5-1- Résistance naturelle

Les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aéro-tolérantes sont naturellement résistantes aux aminosides.

Parmi les espèces aérobies à Gram négatif, certaines sont résistantes à divers aminosides, par exemple *Pseudomonas aeruginosa*.

2-5-2- Résistance acquise

μ Altération de la cible :

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique. Ces mutants résistants ne constituent pas un problème en thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, du fait de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

μ Interférence avec le transport de l'antibiotique :

La pénétration des aminosides, dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe
- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont faiblement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate. Les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotique dans la cellule.

μ Détoxification enzymatique des antibiotiques :

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique de loin. Les enzymes sont divisées en trois classes, aminoside-phosphotransférase (APH), aminoside-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-acétyltransférase (AAC), en fonction de la réaction qu'elles catalysent (phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé) (figure 10) et en sous-classes, en fonction du site de la molécule d'antibiotiques qu'elles modifient.

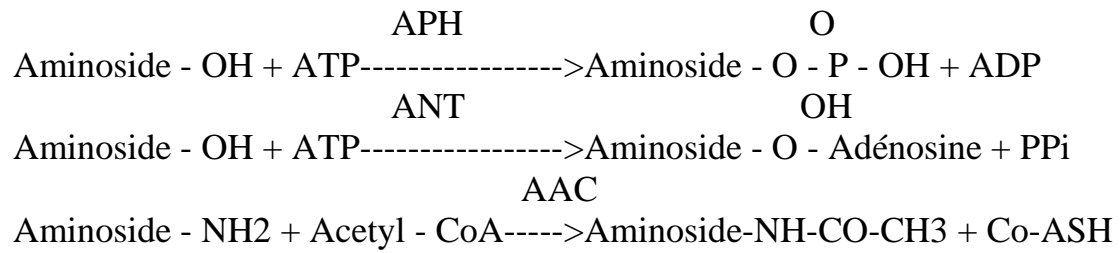


Figure 11 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes diffèrent dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection in-vivo et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance sont encore compliqués. En effet, la majorité des souches résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent de très hauts niveaux de résistance. L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotique non modifié. La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et de l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de "niveau" en soi. Il agit en "amplifiant" le niveau de sensibilité de la bactérie-hôte.

### 2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptococcus sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non-pénétration (bas niveau de résistance), à une modification de la cible ou à une enzyme inactivatrice (haut niveau de résistance), les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieure à 1000mg/ml). Ce HNR a été défini chez les souches cliniques d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition de la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificateurs.

## 2-6- Résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines (22)

### 2-6-1- Résistance acquise

#### + Modification de la cible

#### μ Mécanisme biochimique et déterminisme génétique du phénotype MLS<sub>B</sub>

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la diméthylation d'une adénine dans l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARNr 23S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité entre les MLS et leur cible. La résistance ainsi conférée est croisée entre les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B, dont les sites de fixations sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS<sub>B</sub>.

#### μ Expression de la résistance MLS<sub>B</sub> et sa régulation :

Si la résistance est inductible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C 14 et celle des autres macrolides, des lincosamides et des streptogramines. Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamides et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

#### + Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différentes enzymes. Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés chimiquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases, et nucléotidases.

#### + Imperméabilité

Les souches résistantes n'inactivent pas les antibiotiques; il y a juste une diminution de l'accumulation intracellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport des macrolides en C14.

### 2-7- Résistance aux quinolones (22).

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

Pour être en situation plasmidique, un caractère doit être dominant sur sa contrepartie chromosomique sauvage. Récemment la résistance plasmidique chez des souches de *Shigella* a été rapportée mais le mécanisme biochimique n'a pas été élucidé.

Trois types de mutation au niveau de l'ADN ont été décrites, la mutation NAL A est la plus fréquente et confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

### 2-8- Résistance aux cyclines (22).

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique. Le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance.

Celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotique à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe, régulé négativement, comporte deux gènes : celui de contrôle ou répresseur, et celui de structure ou protéine TET.

Parmi les autres mécanismes de résistance évoqués, l'un est en relation avec la protection des ribosomes (TET M). L'incidence de la résistance par imperméabilité observée chez les souches porine déficiente qui sont exclusivement des espèces à Gram négatif, est encore faible, mais la résistance est croisée avec d'autres antibiotiques comme les bêtalactamines, le chloramphénicol et l'acide nalidixique.

### 2-9- Résistance aux phénicolés (22).

Le mécanisme de la résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire de chloramphénicol-acétyltransférases (CAT), qui inactivent ces antibiotiques en C3 et C1, avec comme cofacteur l'acétyl-coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



TABLEAU VI : Mécanismes de résistance en fonction du déterminisme génétique (26).

**RESISTANCE CHROMOSOMIQUE    RESISTANCE PLASMIDIQUE**  
**SULFAMIDES**

Diminution de perméabilité

Hyperproduction de PAB

Hyperproduction de DHPS

DHPS mutée résistant

DHPS additionnelle

Diminution de perméabilité

**TRIMETHOPRIME**

Diminution de la perméabilité

Auxotrophie en thymine

Hyperproduction de DHFR

DHFR mutée résistante

DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

### III- METHODES DE DETERMINATION *in-vitro* DES CMI

#### 3.1- Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries.

Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories:

- sensible (S) ; lorsque la CMI déterminée *in vitro* est inférieure à la concentration sanguine obtenue après administration d'une dose utilisable en thérapeutique.
- résistante (R) ; lorsque la CMI de l'antibiotique est trop élevée pour être atteinte *in vitro* sans utiliser des doses toxiques.
- intermédiaire (I) ; lorsque, à cause de la valeur élevée de la CMI, les micro-organismes ne pourront être atteints avec une antibiothérapie standard, mais pourront l'être par un traitement administré par voie générale à forte dose (possible seulement avec les produits pas ou peu toxiques) ou par voie locale, ou encore si l'antibiotique se concentre là où siège l'infection.

La détermination de la CMI d'un antibiotique sur une souche bactérienne peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion de l'antibiotique.

#### 3.2.- Méthode par dilution

C'est la méthode de référence. Elle peut être pratiquée en milieu liquide ou solide.

##### 3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide

On prépare une série d'une dizaine de tubes à hémolyse stériles (ou dans les cupules d'une plaque) dans lesquels on répartit une même quantité de bouillon nutritif ensemencé avec une culture de bactéries en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ml (inoculum microbien optiquement invisible). On distribue ensuite dans chaque tube à l'exception du premier qui servira de témoin, sous un même volume, des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié, réalisant une gamme de concentration en progression géométrique de raison 2.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe macroscopiquement pour déterminer la CMI. Dans un certain nombre de tubes, la culture s'est développée, un trouble nettement visible en est la traduction. A partir d'une certaine concentration, il n'y a plus de culture visible. Le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture indique la CMI encore appelée taux inhibiteur ou taux de sensibilité de la souche étudiée

##### 3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide

Consiste à incorporer l'antibiotique dans la gélose coulée en boîte de pétri, réalisant comme précédemment une gamme de concentrations croissantes.

La souche est ensemencée en une strie ou en spot à la surface de la gélose.



Ces deux techniques de dilution sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine, de l'activité d'un grand nombre d'antibiotiques sur une souche bactérienne. La méthode par diffusion permet de pallier à cet inconvénient.

### 3.3. Méthode par diffusion (antibiogramme: méthode des disques)

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries (inoculum  $10^6$  bactéries /ml) en phase de croissance exponentielle. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation du milieu de culture (18 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ ), on constate que chaque disque est entourée d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des micro-organismes s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI. Pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur (approchée) de la CMI de l'agent antimicrobien vis-à-vis de la souche étudiée.

En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celle de la CMI, celle-ci étant établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des bactériennes différentes.

### 3.4. Microméthodes d'étude "*in vitro*" de la sensibilité des germes aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation.

Les appareils utilisés fonctionnent schématiquement selon deux principes : ils miment les tests conventionnels d'étude de la sensibilité (antibiogramme par diffusion ou détermination de la CMI en milieu liquide)

ils comparent la croissance d'un témoin à celle observée en présence d'une ou plusieurs concentrations d'antibiotiques à l'aide d'indices propres à chaque machine. La détection de la croissance peut se faire de manière :

- directe par turbidimétrie ou par néphélémétrie. La plupart des instruments utilisés ne détectent un trouble que si la densité bactérienne atteint  $10^7$  bactéries /:ml  
indirecte : ces méthodes permettent d'estimer la biomasse en mesurant certaines activités enzymatiques bactériennes à l'aide de substrats chromogènes ou fluorogènes incorporés au milieu.

### 3.5. Le E-test<sup>®</sup> (Epsillométer-test)

C'est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone de 15 dilutions allant de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32

mg/l en fonction des molécules ( figure a). Il a été standardisé conformément aux normes du comité national des laboratoires cliniques (NCCLS) .

Le E-test<sup>®</sup> associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse (figure b) dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide ( lecture directe de la valeur de la CMI).

#### IV : Lecture interprétative de l'antibiogramme

En matière d'antibiogramme, il ne suffit plus aujourd'hui de travailler correctement et de transcrire fidèlement les résultats bruts. Pour que l'antibiogramme soit directement utilisable par le biologiste il faut procéder à une lecture interprétative des résultats bruts.

La lecture interprétative de l'antibiogramme consiste à déduire le génotype d'une bactérie (soit le mécanisme de résistance) à partir de l'expression visible sur l'antibiogramme (soit le phénotype) et à corriger la réponse brute de l'antibiogramme (tableau VI'). Ceci est possible en étudiant un ensemble judicieusement sélectionné d'antibiotiques.

Ces antibiotiques peuvent ne pas être utilisés en thérapeutique mais testés, dans le but de détecter un certain nombre de mécanismes biochimiques de résistance.

L'antibiogramme sera donc conçue pour permettre une réponse valable pour chaque classe de molécule.



R S

S Imipenem S S S

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de  
BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE de l'hôpital A.  
Le DANTEC ( H.A.L.D.) de DAKAR ( SENEGAL)*

## II MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Souches bactériennes

#### 2.1.1. Souches à tester

Notre étude a porté sur 213 souches bactériennes isolées et identifiées selon les méthodes classiques d'isolement et d'identification au laboratoire de bactériologie - virologie de l'hôpital A. Le DANTEC (H.A.L.D.), au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de FANN.

Ces souches proviennent des laboratoires de :

Bactériologie - Virologie H.A.L.D.

Bactériologie FANN.

Les espèces bactériennes sur lesquelles nous avons travaillé sont (tableau VII) :

*Escherichia coli*

*Klebsiella pneumoniae*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Proteus spp*

*Enterobacter spp*

Ces souches proviennent de produits pathologiques divers (Tableau VIII )

Urines

L.C.R.,

Hémoculture,

Pus chirurgicaux,

Liquides articulaires,

Liquides pleuraux,

Ces souches ont été isolées entre 1996 et 1998

Toutes les souches testées ont été conservées à - 70°C dans des cryotubes ( NUNC<sup>®</sup> ) contenant du Bouillon Cœur Cerveille (BCC) additionné de 15% de glycérol en trois exemplaires sur trois portoirs différents.

### 2.1.2. Souches de référence

L'utilisation des souches de référence permet de vérifier la conformité des résultats du test.

Les souches de référence recommandées par le fabricant (AB Biodisk, Sölna, Sweden) sont les suivantes :

*Escherichia coli* ATCC 35218

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

## 2.2. Matériel et réactifs

### 2.2.1. Réidentification des souches bactériennes

L'isolement des germes bactériens a été effectuée sur gélose ordinaire ou enrichie selon le germe.

Pour la réidentification des germes nous avons utilisé les méthodes d'identification en microplaque mises au point au laboratoire de bactériologie-virologie de l'H.A.L.D. .

### 2.2.2 - Matériel pour le E-test

#### **\*Matériel**

Bandes de E-test<sup>®</sup>,  
Applicateur de E-test<sup>®</sup>,  
Paquet d'insertion des bandes,  
Boîtes de pétri de 150mm et 90mm de diamètre,  
Paire de ciseaux  
Ecouvillons stériles,  
Tubes à essai stériles,  
spectrophotomètre,  
guide technique pour E-test<sup>®</sup>,  
Normes NCCLS et indications M 100 - S,

**Tableau VII : Effectif des souches bactériennes**

Espèces bactériennes	Nombre	Pourcentage	Enterobacter spp
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62	29.10 %	<i>Escherichia coli</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	12	5.63%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	49	23.00%	
<b>TOTAL</b>	<b>213</b>	<b>100%</b>	

**\*Réactifs**

Eau physiologique,  
Milieu : Müller Hinton  
Echelle Mc Farland ( 0,5 )

2.2.3. Détection des  $\beta$ -lactamases

a)- Méthode à la "céfinase" ( Biomérieux)

**\*Matériel**

Lames porte objet,  
Pipettes Pasteur.

**\*Réactifs**

Disque de nitrocéfine,  
Eau physiologique.

## 2.2.4. Matériel pour la conservation

Cryotubes type NUNC® pour la conservation.  
BCC additionné de 15% de glycérol  
Lait écrémé à 10%  
Sérum de veau foetal  
Gélose au sang cuit en boîte ou en tube avec une pente

## 2.2.5. Matériel pour l'analyse des résultats

L'analyse des résultats a été effectuée par le logiciel WHONET IV  
Le WHONET est une série de programmes informatiques qui facilite la gestion des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de germes bactériens. Des programmes d'analyse utilisant ces données aident à la meilleure compréhension de l'épidémiologie des résistances aux antibiotiques et le développement de pratiques de prescription rationnelles et de procédures de contrôle des infections. Ces données pourront être employées à un niveau local et pourront aider les laboratoires dans la sélection des antibiotiques en reconnaissant et en soulevant des problèmes de résistance au plan local et en identifiant des problèmes de contrôle de qualité. Le but du programme WHONET est l'établissement de réseaux nationaux et internationaux de surveillance continue de la résistance sur une échelle assez large.

## 2.3. Méthodes

## 2.3.1. Méthode détermination de la sensibilité par E-test®

Sortir les paquets de bandes et les tubes de rangement du freezer (-20°C) et laisser



les bandes à la température ambiante,  
Lire la notice intérieure

#### 2.3.1.1. Préparation de l'inoculum

Utiliser des colonies viables pour préparer l'inoculum,  
Disposer de colonies viables ;obtenues en faisant une suspension d'une colonie dans un bouillon nutritif ,incubé à 37°c pendant 4 heures.  
Ajuster la turbidité de la suspension à 0,5 Mc Farland en déterminant la D.O. au spectrophotomètre comparativement à celle du témoin.

### 2.3.1.2. Inoculation

La méthode d'ensemencement du milieu préconisée par le NCCLS est la méthode par écouvillonnage ou méthode KIRBY - BAUER.

Ensemencer sur des boîtes de pétri contenant de la gélose d'une épaisseur de  $4 \pm 0.5$  mm.

S'assurer que la surface gélose est bien sèche avant de procéder à l'écouvillonnage. Plonger un écouvillon dans l'inoculum, bien essorer l'écouvillon sur les bords du tube, écouvillonner entièrement la surface de la gélose dans trois directions différentes .

Laisser sécher à la température ambiante environ une quinzaine de minutes.

### 2.3.1.3. Application des bandes

Il faut s'assurer que la surface de la gélose ensemencer est entièrement sèche. Avec l'applicateur, déposer la bande de E-test sur la gélose.

Il faut toujours appliquer la bande en mettant l'échelle de la CMI face à l'ouverture de la boîte. Il ne faut pas la mettre à l'envers.

Assurer un bon contact entre la bande et la gélose en appuyant sur la bande en partant de la base.

Il ne faut jamais déplacer la bande après application, car l'antibiotique diffuse immédiatement après contact dans la gélose.

### 2.3.1.4. Incubation

L'incubation se fait à  $37^\circ$  pendant 18-24 h .

### 2.3.1.5. Lecture

les boîtes sont lues après la période d'incubation recommandée, à condition d'avoir une croissance significative à la surface de la gélose et que l'ellipse d'inhibition soit clairement visible. ( figure c )

La C.M.I. est lue au point d'intersection de l'ellipse et de la bande (figure b). La lecture ne présente pas de difficulté lorsque la zone d'inhibition est parfaitement définie et symétrique. Dans les autres cas, une interprétation est nécessaire : l'observation d'un décrochage ou "dip" dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse (figure d). la présence de colonies "squatter" doit être analysée ; il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou de mélanges bactériens (figure e).

l'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de la CMI et ne doit pas interférer avec la lecture (figure f).

la présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a pas de signification bactériologique et est certainement due à gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette (figure g ).

les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques ; la CMI correspond à la concentration la plus haute lue sur la règle (figure h).

Dans tous les cas les souches de référence doivent être étudiées en parallèle

comme contrôle de qualité afin de valider le test et aussi d'éviter les erreurs. Il faut lire en premier les résultats des souches de référence

#### 2.3.1.6. Contrôle de qualité

Outre l'utilisation des souches de référence pour valider le test, les contrôles de qualité doivent s'effectuer à tous les niveaux :

##### *Les souches de référence*

Un certain nombre de règles doivent être respectées ;

- \* utiliser des souches de référence sûres type ATCC
- \* entretenir correctement les souches de contrôle de qualité ; pour cela les conserver selon deux méthodes, soit en stock de culture pour l'utilisation fréquente des souches, soit à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans des cryotubes pour une conservation longue durée. Quarante exemplaires sont établis pour chaque souche de contrôle répartis sur deux portoirs différents, conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$  (freezer).

##### *Milieux et réactifs*

Pour assurer une bonne qualité des résultats il faut :

- \* vérifier les dates de péremption des milieux et réactifs.
- \* un stockage correcte des milieux de culture, des bandes de E-test avec un relevé quotidien de la température du freezer et du frigo.
- \* une manipulation correcte avec respect de la démarche du protocole établi.
- \* une sélection correcte de la terminaison en pointe de la CMI.
- \* un contrôle de la gélose, c' est à dire ;
  - \*\* de la profondeur.
  - \*\* de la capacité de croissance supportée.
  - \*\* de la présence d'antagonistes tels la thymidine, la thymine et des ions.

#### 2.3.2. Méthodes de détection des $\beta$ -lactamases :

##### 2.3.2.1. Méthode à la céfinase

###### Principe:

C'est une méthode chromogénique. Le principe repose sur le changement de couleur de certaines céphalosporines ( Nitrocéfine et Padac) en solution aqueuse lorsque les liaisons  $\beta$ -lactames sont rompues par l'action des  $\beta$ -lactamases.

###### *b) Technique*

On utilise des disques imprégnés à la nitrocéfine + BCP (disque de céfinase). ces disques sont imbibés d'eau physiologique, puis on y dépose une anse de colonie grâce à une pipette Pasteur.

Si la souche produit une  $\beta$ -lactamase, le disque se colore en rouge.

C'est une méthode très sensible pouvant même détecter d'autres enzymes n'intervenant pas dans la résistance bactérienne.

### III- RESULTATS.

Notre étude a porté au total sur 213 isolats bactéries ( provenant de divers prélèvements) dont

70 *Escherichia coli* ,

49 *Pseudomonase aeruginosa* ,

62 *Klebsiella pneumoniae*

20 *Enterobacter spp*

12 *Proteus*.

Un ensemble d'antibiotiques a été testé sur ces différentes espèces.

La recherche de bêtalactamases a été effectuée sur toutes les souches.

#### 3-1- RESULTATS GLOBAUX

##### 3-1-1- Résultats de la sensibilité aux bêtalactamines

Pour chaque espèce, les résultats des CMI sont répertoriés dans les tableaux. La distribution des souches testées en fonction des CMI est représentée sous forme d'histogramme.

*Escherichia coli* ( Tableau X, figures 12 à 17 ).

*Escherichia coli* présente une forte résistance à l'amoxicilline ( 68% ), cette résistance s'accompagne d'une résistance à la Pipéracilline (54%) et à la Céfaloline ( 62% ).

La restauration de la sensibilité par l'association Amoxicilline – Acide clavulanique n'est obtenue que dans la moitié des cas (54%) et avec des CMI élevées CMI50 = 8µg/ml CMI90=24g/ml supérieures au seuil de sensibilité ( 8 µg/ml). La Céfotaxime a une meilleure activité avec 96% de souches sensibles avec des CMI basses CMI50 = 0,064 µg/ml CMI90 = 0,038 µg/ml. La Céfoxitine a inhibé 94% des souches avec une CMI50 faible (2µg/ml).

*Klebsiella – pneumoniae* (Tableau XI, figures 18 à 23).

Forte résistance de cet espèce à l'Amoxicilline, à la Pipéracilline, à la Céfaloine ainsi qu'au Mécillinam.

La Céfoxitine et la Céfotaxime présentent une bonne activité avec des sensibilités respectives de 84% et 70%.



❖ *Proteus mirabilis* ( Tableau XII, figures 24 à 29 ) .

58% des souches testées sont sensibles à l'Amoxicilline. L'Association à l'acide clavulanique augmente la sensibilité (80%) avec des CMI relativement basses.

La Pipéracilline conserve une bonne activité ( 83% ) mais les CMI restent élevées.

Les céphalosporines présentent une bonne activité . La Céfoxitine présente la meilleure avec 100% de sensibilité ceci avec des CMI très bas CMI<sub>50</sub> = 3µg/ml CMI<sub>90</sub> = 4µg/ml.

CMI inférieures au seuil de sensibilité (8 µg/ml).

❖ *Pseudomonas. aeruginosa* ( Tableau XIII, figures 30 à 36 ) .

La Ticarcilline a inhibé 47% des souches testées. L'Association avec l'acide clavulanique a améliorée la sensibilité (59%) mais avec des CMI élevées.

La Pipéracilline , l'Aztreonam, Imipénème, ont donné respectivement des taux de sensibilité de 59% - 58% - 77%.

La Céfotaxime et la Céfépime ont donné des taux de sensibilité de 92% , 83%.

Avec des CMI basses inférieures au seuil de sensibilité ( 8µg/ml ) .

❖ *Enterobacter spp.* ( Tableau XIV, figures 37 à 42 ) .

95% des souches testées résistent à l'Amoxicilline. L'Association avec l'acide clavulanique améliore peu la sensibilité (25%).

Cette résistance s'accompagne d'une résistance à la Céfaloine et au Mécillinam.

La Pipéracilline présente 55% d'activité avec des CMI élevées.

La céfoxitine présente une mauvaise activité ;seulement 40% des souches testées sont sensibles.

Seule la Céfotaxime conserve une bonne activité avec cependant une CMI<sub>90</sub> élevée.

### 3-1-2- Résultats de la sensibilité aux autres antibiotiques testés.

- ❖ *Escherichia Coli* ( Tableau X, figures 43 à 47).

Les Aminosides : présentent une très bonne activité.

L'Amikacine et la Gentamicine ont donné des taux respectifs de 100% et 91% avec des CMI très basses

CMI50 = 1,5 µg/ml CMI90 = 2 µg/ml (AMK)= 2µg/ml au seuil de sensibilité (16 µg/ml)

CMI50 = 0,75 µg/ml CMI 90 = 3 µg/ml (GEN)

Elles sont par ailleurs inférieures au seuil de sensibilité (16µg/ml) (4µg/ml).

Les Quinolones : l'Acide nalidixique et la Ciprofloxacine.

Toutes deux ont une très bonne activité. Le Cotrimoxazole donne une résistance de 55%.

- ❖ *Klebsiella pneumoniae* ( Tableau XI, figures 48 à 52) .

Les Quinolones présentent une très bonne activité. La Ciprofloxacine a inhibé 95% des souches. Cependant une résistance de 33% apparaît avec l'acide Nalidixique.

Aminosides : La résistance à l' Amikacine est nulle. Elle présente des CMI faibles CMI50 = 2µg/ml

CMI90= 8 µg/ml inférieure au seuil de sensibilité (16 µg/ml).

La Gentamicine conserve une assez bonne activité avec une sensibilité de 61% mais avec une CMI90 (48 µg/ml) élevée

63% des souches testées résistent à l'association Triméthoprim – sulfaméthoxazole.

Tab10 et 11

❖ *Proteus mirabilis* ( Tableau XII, figures 53 à 57 ).

Les Aminosides : La Gentamicine et l'Amikacine ont inhibé respectivement 75% et 100% des souches testées avec des CMI basses pour l'Amikacine CMI<sub>90</sub> = 2 µg/ml inférieures au seuil de sensibilité (16 µg/ml).

Les Quinolones : Toutes les souches ont été inhibé par la Ciprofloxacine alors que toutes résistent à l'acide Nalidixique.

*Proteus mirabilis* présente une très forte résistance à l'association Triméthoprim - sulfaméthoxazole.

❖ *Pseudomonas aeruginosa* ( Tableau XIII, figures 58 à 60).

La gentamicine et l'Amikacine ont inhibé respectivement 86% et 96% avec CMI<sub>90</sub> relativement élevées.

❖ *Enterobacter spp.* ( Tableau XIV, figures 61 à 65).

Les Aminosides : La Gentamicine et l'Amikacine inhibent respectivement 75%, 95% des souches. Mais seule l'Amikacine présente des CMI faibles CMI<sub>90</sub> = 6 µg/ml.

Les Quinolones : ont une totale activité sur les souches d'Entérobacter, avec des CMI basses.

L'Association Triméthoprim- sulfaméthoxazole présentent une activité moindre (60%) avec une CMI<sub>90</sub> très élevée (32µg/ml).



**Tab12 et 13**

**Tab14**

## 3-1-3- Résultats de la détection des bêta-lactamases : Tableau VIII

Espèces	Nombre de souches testées	Souches bêta-lactamases positives	
		Nombre	Pourcentage
<i>Escherichia - Coli</i>	70	70	100
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	62	60	96,8
<i>Proteus spp</i>	12	10	83,3
<i>Enterobacter</i>	20	20	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41	41	100

Nous notons une très forte production des bêta-lactamase pour toutes les espèces.

### 3-1-4- Résultats du phénotypage.

Les entérobactéries ont été phénotypées suivant les critères du tableau VII.

Nous avons retrouvé les phénotypes suivants :

#### Résultats des phénotypes de résistance des souches testées Tableau IX

Phénotype	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sauvage	11(15,71%)	22 (35,48%)	4 (33,35%)	3 (15%)	17- (35,42%)
Pénicilimase haut niveau	29(41,43%)	12 (19,35%)	3 (25%)	3 (15%)	20(41,67%)
Bêta lactamase TEM	20(28,57%)	2 (3,23%)			
E S BLA		20(32,26%)	4 (33,33%)	1 5%	
Perméabilité		6 (9,68%)			
Pénicillinase bas niveau	10(14,29%)		1(8,33%)	1 5%	
Cephalosporinas e				12 60%	11(22,91%)

### 3-2- Résultats de la sensibilité en fonction des produits pathologiques.

#### 3-2-1- Sensibilité des souches isolées d'urines des malades hospitalisés.

##### 3-2-1-1- Sensibilité de *Proteus mirabilis*. Tableau XV

L'Amoxicilline donne une mauvaise activité sur les souches testées. Activité totalement restaurée par l'association à l'acide clavulanique.

Ces souches sont totalement sensibles à la Céfotaxime, à la Céfoxitine à l'Amikacine et à la Ciprofloxacine.

Par contre elles sont résistantes à l'acide Nalidixique et au Triméthoprime / sulfamethoxazole.

Tab15

### 3-2-1-2- Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* Tableau XVI

Aucune souche testée n'a été sensible à l'Amoxicilline, l'association acide clavulanique – amoxicilline restaure l'activité de l'Amox (67%).

Nous avons en même temps une résistance au Pipéracilline et à la Céfaloine.

La Céfotaxime et la Céfoxitine donnent de bons taux d'inhibition mais seules les CMI de la Céfotaxime sont faibles.

### 3-2-1-3- Sensibilité de *Escherichia coli* Tableau XVII

Aucune souche testée n'a été sensible à l'amoxicilline, dont l'activité a été partiellement restaurée par l'association Amoxicilline - clavulanique (54%).

Nous observons une résistance à la Céfaloine 54% et une moindre résistance au Pipéracilline (23%). La Céfotaxime et la Cefoxitine ont donné de bons taux d'inhibition avec des CMI basses.

### 3-2-1-4- Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* Tableau XVIII

Les souches urinaires de *Pseudomonas aeruginosa* montrent une bonne sensibilité vis à vis de la Ticarcilline ainsi que vis à vis de la Piperacine.

Par contre, l'association de la Ticarcilline à l'Acide clavulanique n'a pas donné de bons résultats.

La Cifepime et la Ceftazidime donnent les meilleurs résultats avec respectivement 86 et 88% de sensibilité.

L'Imipeneme et Aztreoname donnent des sensibilités moindres.

L'Amikacine reste très actif (88% de sensibilité) alors que la gentamicine donne une sensibilité moyenne : 50%.

La Ciprofloxacine est la plus active de tous les antibiotiques testés sur les souches urinaires de *Pseudomonas aeruginosa* avec 100% de sensibilité.

**Tab16 et 17**

**Tab18**



### **3-2-2- Sensibilité de souches isolées d'Hémoculture.**

#### **3-2-2-1- Sensibilité des souches de *E. coli* isolées d'Hémoculture de malades hospitalisés Tableau XIX**

Les résultats sont semblables à ceux des souches isolées d'urines et de Pus.

#### **3-2-2-2- Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* Tableau XX**

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* se sont montrées globalement résistantes aux antibiotiques testées sauf à la Céfoxitine, à l'Amikacine et à la Ciproflaxacine qui est la seule à avoir des CMI basses.

#### **3-2-2-3- Sensibilité des souches d'*Enterobacter* spp Tableau XXI**

Aucune souche testée n'a été sensible à l'Amoxicilline.

Nous observons également une mauvaise activité de l'Association Amoxicilline-acide clavulanique ainsi que de la Pipéracilline.

La Céfotaxime et la cefoxitine ont montré une bonne sensibilité , mais avec des CMI90 élevées.

La Ciprofloxacine donne les meilleurs résultats (100%).

**Tab19 et 20**

**Tab21**

### **3-2-3- Résultats de la sensibilité des souches isolées de Pus de malades Hospitalisés.**

#### **3-2-3-1- Sensibilité de *Escherichia coli* ( Tableau XXII).**

Aucune souche n'a été sensible à l'Amoxicilline dont l'activité est améliorée par l'association avec l'acide clavulanique.

Nous remarquons une résistance à la Céfalotine , à la Pipéracilline et au Triméthoprim / Sulfaméthoxazole.

Les Céphalosporines telles que la Céfotaxime et la Céfoxitine donnent de bons taux d'inhibition avec des CMI basses.

Les Aminosides sont également très actifs avec 91% et 100% de sensibilité respectivement pour la Gentamicine et l'Amikacine.

La Ciprofloxacine a donné les CMI les plus basses (0,023µg/ml = CMI50 0,125 µg/l # CMI90).

#### **3-2-3-2- Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* (Tableau XXIII)**

Les souches testées présentent une certaine résistance aux différents antibiotiques utilisés.

Résistance à la Céfalotine, à la Pipéracilline, au Cotimoxazole et même à la Ciprofloxacine (14%).

#### **3-2-3-3- Sensibilité d'*Enterobacter spp* ( Tableau XXIV)..**

Les souches testées ont été totalement résistantes à l'Amoxicilline, à l'association Acide – clavulanique- amoxicilline, à la Céfoxitine.

Cette résistance s'accompagne d'une résistance à la Pipéracilline et au Cotrimoxazole.

Tab22 et 23

Tab24

#### 3-2-3-4- Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* ( Tableau XXV)..

La Ticarcilline présente une activité moyenne sur les souches testées ; activité peu améliorée par l'association d'avec l'acide clavulanique.

La Céfotaxime et l'Imipenem ont donné de faibles taux d'inhibition. Contrairement à la Cefepime qui s'est montré active (84%)

L'aztréonam présente une activité moyenne (54%).

Les aminosides donnent également de bons résultats.

#### 3-2-4- Comparaison des profils de sensibilité entre les souches provenant d'hospitalisés et de malades externes.

##### 3-2-4-1- Sensibilité de *Escherichia coli* .Tableaux XXVI-XXVII

*E. coli* présente un profil de sensibilité aux antibiotiques identiques pour les malades hospitalisés que pour les externes.

Nous notons seulement qu'aucune souche n'a été sensible à la Céfotaxime chez les malades externes.

##### 3-2-4-2- Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* Tableaux XXVIII , XXIX

Nous notons une résistance plus importante à la Céfotaxime chez les hospitalisés (69%), elle est de 17% chez les patients externes.

Résistance à la Céfotaxime, même si elle est moindre (9%) chez les hospitalisés alors qu'elle est de 0% chez les patients externes.

L'activité de la Pipéracilline est plus importante chez les souches provenant des patients externes (67%) alors qu'elle est de 25% chez les hospitalisés.

##### 3-2-4-3- Sensibilité de *Proteus mirabilis* Tableaux XXX - XXXI

Les souches de *Proteus* provenant d'hospitalisés présentent 14 % de résistance à la Céfotaxime, résistance qui est nulle chez les externes.

La Gentamicine présente une résistance de 25% chez les hospitalisés qui est nulle chez les externes.

La Pipéracilline est plus active sur les souches des patients externes.

La Cotrimoxazole présente une activité moyenne sur les souches des patients externes 50%, une activité qui demeure faible chez les souches des patients hospitalisés.

**3-2-4-4- Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* (Tableaux XXXII – XXXIII)**

La Ticarcilline est plus actives sur les souches des patients hospitalisés.

La résistance à la Pipéracilline est plus importante chez les souches des patients externes.

La Gentamicine montre une résistance faible 7%, on observe une resistance à la Ciprofloxacine :6% chez les hospitalisés qui n'existe pas chez les patients externes.



Tab 25

Tab 26 et 27

Tab 28 et 29

Tab 30 et 31

Tab 32 et 33

Tab 34 et 35

## IV- DISCUSSION

Les différents résultats que nous avons trouvés feront l'objet d'une comparaison avec d'autres résultats, afin d'évaluer l'évolution du comportement des différentes espèces bactériennes vis à vis des différents antibiotiques.

### 4 –1 Etude de la sensibilité en fonction des germes.

#### 4.1.1. *Escherichia coli*

##### 4.1.1.1. Les Bêta-lactamines.

Dans notre étude, la résistance à l'Amoxicilline a concerné 68% des souches de *Escherichia coli*, conformément aux travaux de FAYE réalisés à l'HALD en 1997 (27) et à ceux de SY K R. réalisés en 1996 à l'Hald ( 76) qui sont respectivement de 65,6% et 67%.

Ces pourcentages sont bien au delà de ceux rapportés par certains auteurs 33,9%,34,4%, et 51,5% (62,63,80,).

L'Association Amoxicilline - acide clavulanique a inhibé 54% des souches.

A l'hôpital FANN (50), en 1996, l'association acide clavulanique s'est montrée peu active sur les souches de *Escherichia coli* testées (71,44% de résistance). En 1992, N DIAYE Kh. Y. (56) dans une étude faite dans un C.H.U. à Dakar, a retrouvé un taux de résistance de 70%.

Des études réalisées par la méthode du E-Test® ont montré :

- A LAGOS, au NIGERIA (60) 50% de résistance à l'amoxicilline seule , et 45,7% de sensibilité à l'association amoxicilline –acide clavulanique et environ 94,6% des souches sont sécrétrices de bêtalactamases.
- Au MAROC (40) 55% étaient sensibles à l'amoxicilline seule et 66,6% à l'association amoxicilline acide clavulanique.

La résistance à l'amoxicilline est certainement due à la production de bêta-lactamase. Cette production d'enzymes est confirmée par les résultats de la recherche des bêtalactamases avec 100% des souches sécrétrices d'enzymes. Les résultats du phénotypage ont d'ailleurs montré que 41,43 %, sont du phénotype haut niveau et bêtalactamase TEM 20%.

Dans notre étude, la résistance à l'amoxicilline s'est accompagnée d'une résistance au mécillinam, à la pipéracilline et à la céfalotine.

Les résistances à la pipéracilline et à la céfalotine sont retrouvées dans l'étude menée à FANN (50) en 1996 avec respectivement 30% et 35% et à l'hôpital HALD (76) en 1997 elle est de 56%, 52%.

En Algérie la résistance était de 60% et 40% respectivement pour la pipéracilline et pour le mecillinam (68).

Les céphalosporines sont très actives avec respectivement 94% et 96% pour la céfoxitine et la céfotaxime. Résultats identiques à ceux de FAYE I. (27)

A ABIDJAN et à LAGOS (60) des sensibilités de 100% pour la céfotaxime ont été observé.

Ces résultats démontrent que le mécanisme le plus courant de résistance de E.-coli est la sécrétion d'enzymes ; la céfoxitine est un marqueur de la résistance par imperméabilité.

#### 4.1.1.2. sensibilité aux aminosides.

Une bonne activité des aminosides a été mise en évidence : 91% et 100% de sensibilité respectivement pour la gentamicine et l'amikacine. Cette bonne activité est confirmée par de nombreuses études (27, 40, 9, 24, 60, 68, 76). Toutefois signalons l'apparition d'une résistance à la gentamicine qui est de 9% dans notre étude. Elle était de 8,8% dans l'étude de SY K. (76) en 1996.

A COTONOU, 15,6 % des souches d'*Escherichia coli* étaient résistantes en 1992 (4).

Cette résistance peut s'expliquer par la présence d'enzymes de modification de la gentamicine. Ce phénomène s'observe notamment en Italie, en Espagne, en Argentine, au Mexique.

#### 4.1.1.3. Sensibilité aux quinolones.

La ciprofloxacine présente une très bonne activité (94% de souches avec des CMI très basses). Des études réalisées à l'hôpital Le DANTEC (76) et à FANN (M BOUP) en 1996 ont donné une sensibilité de toutes les souches à la ciprofloxacine. Nos résultats sont proches de ceux signalés par les travaux de FAYE I. (27) avec 90% de sensibilité.



L'acide Nalidixique montre une bonne activité ; 86% des souches sont inhibées, chiffre proche de ceux obtenus par FAYE I. (27) (87%), Ben REJEB, (93,1%) (9) ; RAHAL (60%) (68) et au CHU de Cotonou (83,9% en 1992) (3).

Une résistance de 4% à la Ciprofloxacine et de 9% à l'acide nalidixique est apparue dans notre étude.

Plusieurs mécanismes ont été décrites :

La mutation des souches et la consommation importante d'antibiotiques (25, 59).

#### 4-1-1-4- Sensibilité au Cotrimoxazole

Le Cotrimoxazole montre une sensibilité de 45%.

Des résultats comparables ont été retrouvés au Cameroun (42,10%), au Kenya (50%).

Le Cotrimoxazole, antibiotique largement répandu aussi en milieu hospitalier qu'en pratique de ville a été ici faiblement actif.

Toutefois de meilleurs résultats ont été obtenus à Tunis (9) et à Alger (68).

L'utilisation très fréquente de cet antibiotique en automédication à Dakar serait sans doute la principale raison de cette baisse d'activité (3).

### 4.1.2. Sensibilité de *Klebsiella pneumoniae*

#### 4.1.2.1. Les Bétalactamines

Les Klebsielles présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines et carboxypénicillines par production d'une pénicillinase de bas niveau correspondant au phénotype sauvage.

Toutes les souches testées sont résistantes à l'amoxicilline. Avec une restauration de l'activité par association à l'acide clavulanique dans seulement 53% des cas ; les CMI demeurant élevées. La recherche de bétalactamases a montré 96,8% de souches sécrétrices de bétalactamases.

Les phénotypes de résistance rencontrés sont :

Sauvage :	35,48%
Pénicillinase haut niveau	19,35%
Bétalactamases à spectre étendu	32,26%
Perméabilité	09,68%

Ces résultats montrent que la résistance est liée à la production de bêtalactamases. Cette résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines est due à la production naturelle constitutive d'une pénicillinase chromosomique (59) ou à l'acquisition de bêtalactamases d'origine plasmidique (77).

Les souches sécrétrices de pénicillinases sont résistantes à l'amoxicilline mais l'adjonction d'acide clavulanique restaure tout ou partie de l'activité de la pénicilline A (1).

C'est également chez *Klebsiella pneumoniae* que les bêtalactamases les ont été décrites pour la première fois (49, 57). La pipéracilline, le mécilliname et la céfalotine ont présenté une mauvaise activité. La céfoxitime et la céfotaxime ont montré les meilleurs résultats avec des sensibilités respectives de 84% et 70%. Les CMI sont cependant élevées. Cette bonne activité corrobore les résultats d'une étude menée en France de 1989 à 1993 avec des taux de 96% (1989), 98% (1990), 95,5% (1991), 96,5% (1992), 57% (1993) pour la céfotaxime (78).

#### 4.1.2.2. Les Aminosides.

Les aminosides montrent une bonne activité, l'Amikacine inhibe 95% des souches, taux proches de ceux de FAYE (27), de M BOUP (50) et SY K.R. (76) RAHAL (95%) (68), BEN BACHIR (66,66%).

L'amikacine et la gentamicine (61%) constituent une bonne alternative pour le traitement d'infection à *Klebsiella pneumoniae*.

#### 4.1.2.3. Les Quinolones.

Les quinolones se sont révélées très efficaces sur *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que le laissait prévoir la littérature africaine et française (29, 42, 49, 67).

#### 4.1.2.4. L'association Triméthoprime –Sulfaméthoxazole.

Le Cotrimoxazole présente une faible activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* avec 63% de résistance. Cette faible activité est imputable à l'automédication et à la pression de sélection exercée par cet antibiotique.

### 4.1.3. *Proteus mirabilis*

#### 4.1.3.1 Les bêtalactamines

Nous avons trouvé une sensibilité moyenne à l'amoxicilline (58%) qui s'améliore avec l'association avec l'acide clavulanique (80%) avec une diminution des CMI. La résistance à l'amoxicilline serait donc liée à la production des bêtalactamases. Notre étude montre 83,3% de souches sécrétrices.

Le phénotype sauvage concerne 33,33%, tandis que 8,33% sont de phénotype <<Pénicillinase bas niveau >>, le phénotype <<Pénicilline haut niveau >> a concerné 25% des souches.

Les travaux de FAYE I en 1997 (27) ainsi qu'une étude menée à l'Hôpital FANN en 1996 ont rapporté des taux respectifs de 55% et 50% de sensibilité, taux proches du nôtre.

Au MAROC en 1995 (40) un taux d'inhibition de 44,4% a été rapporté pour l'amoxicilline et de 82,3% pour l'association amoxicilline acide clavulanique avec une CMI 90 significativement diminuée (24µg/ml contre > 256µg) ml pour l'amoxicilline seule.

Nous notons ici une bonne activité de la pipéracilline (83%) mais avec une CMI90 élevée (>256 µg/ml). Les céphalosporines présentent une activité variable :

La céfalotine présente une activité moyenne 58% contre 90% pour la céfotaxime avec des CMI faibles.

La céfoxitine présente la meilleure activité : 100% avec des CMI basses inférieures au seuil de sensibilité.

L'étude de l'Hôpital FANN (50) a donné un taux d'inhibition proche du notre (94,04%) pour la céfotaxime, celle de DOSSO 100% (24) et celle d'ODUGBEMI 66,66% (60).

#### 4.1.3.2. Les aminosides

L'amikacine s'est montrée plus active que la gentamicine ; respectivement 100% et 75% de sensibilité contrairement à l'étude de FAYE I. (27) 89% et 100% conformément à l'étude de MBOUP (50) qui a montré un taux de sensibilité supérieure pour l'amikacine 88,8 % de même que celle de LAGOS (100%), pour l'amikacine et 70% pour la gentamicine.

#### 4.1.3.3. Les quinolones

Toutes les souches testées ont été sensibles à la ciprofloxacine. Ces résultats corroborent ceux de FAYE I. et de MBOUP (50) SCHEFTEL, en France a montré une bonne sensibilité des *Proteus* à la ciprofloxacine.

#### 4.1.3.4. L'association Triméthoprim –Sulfaméthoxazole.

Le Cotrimoxazole présente une mauvaise activité sur les souches de *Proteus* (25%), cette valeur est inférieure à celles trouvées par FAYE I. (27) 67% et à LAGOS 100% (60). Mais elle est compatible à celles trouvées par MBOUP (27,77%) (50) et DOSSO (40%) (24).

La sensibilité de cet antibiotique est véritablement en baisse, et doit être surveillée car elle est très utilisée dans nos structures hospitalières.

#### 4.1.4. *Enterobacter spp*

##### 4.1.4.1. Les Bêtalactamines.

Ces espèces présentent naturellement une résistance aux aminopénicillines, à la céfalotine et aux céphalosporines de deuxième génération (57). Elles synthétisent une céphalosporinase chromosomique inductible : la recherche de bêtalactamase montre 100% de souches. Le phénotype sauvage << céphalosporinase bas niveau (inductible)>> concerne 15% des souches. Le phénotype résistant <<céphalosporinase haut niveau >> concerne 60% des souches.

Cette production spontanée d'enzymes explique la résistance observée dans notre étude à l'encontre de l'amoxicilline 95%, de l'association amoxicilline- acide clavulanique 65% et à la céfalotine 85%.

La pipéracilline conserve une activité moyenne sur les espèces 55%.

Les céphalosporines présentent une activité variable. La céfoxitine montre une faible activité sur *Enterobacter* 40%, tandis que la céfotaxime donne 70% d'inhibition avec une CMI90 élevée. Ces résultats corroborent ceux d'une étude réalisée au CAMEROUN (40) avec résistance totale à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline - acide clavulanique, à la céfalotine et à la céfoxitine .

#### 4.1.4.2. Les aminosides.

L'efficacité des aminosides sur *Enterobacter* reste satisfaisante avec par ordre d'efficacité décroissante : Amikacine avec 95% de sensibilité et la gentamicine 75%.

L'étude du CAMEROUN a montré 100% de sensibilité pour l'Amikacine et 75% pour la Gentamicine.

#### 4.1.4.3 Les quinolones.

Toutes les souches testées sont sensibles à la ciprofloxacine ainsi qu'à l'Acide nalidixique.

#### 4.1.4.4. L'association Triméthoprime-sulfaméthoxazole.

Le cotrimoxazole conserve une bonne activité avec 60% de sensibilité.

Nous notons également l'apparition d'un taux important de résistance 40% qui peut s'expliquer par la production de céphalosporinases inductibles, ou par l'existence de mutants déréprimés (17).

### 4.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

#### 4.1.5.1. Les Bétalactamines.

Le bacille pyocyanique est la bactérie la plus importante du groupe de bacilles à Gram négatif non fermentaires par sa fréquence, son pouvoir pathogène potentiel et sa multirésistance aux antibiotiques. Ce qui pose de réels problèmes en thérapeutique.

Dans notre étude les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont moyennement sensibles à la ticarcilline (49%), l'association avec l'Acide clavulanique améliore peu la sensibilité (59%).

Les résultats de la recherche aux bétalactamases et du phénotypage montrent :

- 100% des souches sécrétrices de bétalactamases.
- 41,67% sont de pénicillinases haut niveau.
- 22,91% sont de céphalosporinases haut niveau.

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est liée à la production de bêtalactamases, à des modifications de perméabilité ou de protéines membranaires (49).

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont légèrement sensibles à la piperacilline.

L'Aztreonam conserve une bonne activité avec 58% de souches sensibles et 27% de souches intermédiaires.

La ceftazidime, la cefepime et l'imipenem donnent les meilleurs résultats avec des taux d'inhibition respectifs de 92%, 83%, 77%.

Nous notons également une absence de résistance à la cefépime. Ceci s'explique par le fait que c'est une nouvelle molécule, ayant une faible induction et affinité pour les enzymes (39).

#### 4.1.5.2. Les aminosides.

Ce germe s'est montré sensible à la gentamicine (86%), très sensible à l'Amikacine (96%).

D'après Fujita et Vurmau –Rapp. cités par BA M. (6) l'Amikacine serait le meilleur antipycyanique. La même sensibilité a été rapportée par ODUGBEMI (60) et DOSSO (24). Des taux de sensibilité inférieurs ont été trouvés par RAHAL (87%) (68) BEN REJEB (84,6%) (9) et au CHNU de COTONOU (57,8%) (40).

#### 4.1.5.3. Les quinolones.

La Ciprofloxacine présente une très bonne activité 93% avec des CMI très basses inférieures au seuil de sensibilité. Cette activité est confirmée par les résultats obtenus à l'hôpital A. Le DANTEC en 1996 (70) (6) et à l'hôpital FANN en 1996 100% (50). Ceci montre que la ciprofloxacine reste une molécule de choix contre le bacille pyocyanique.

#### **4-2- Comparaison de la Sensibilité des souches d'hospitalisés avec celles de malades externes.**

Globalement, sur l'ensemble des souches testées, les résistances observées sont plus importantes chez les hospitalisés que chez les externes. Ce sont des souches hospitalières et sur lesquelles s'exercent la pression de sélection des antibiotiques, elles sont à germes multirésistants.

Pour exemple :

La Piperacilline a inhibée 67% des souches de *K Pneumoniae* isolées de malades externes alors qu'elle n'inhibe que 25% des souches isolées de patients hospitalisés.

L'association amoxicilline Acide clavulanique présente une activité de 67% sur les souches de malades externes de *Klebsiellas* alors qu'elle est de 52% pour les souches de malades hospitalisés.

## CONCLUSION

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, la flore bactérienne a su chaque fois s'adapter aux dernières molécules commercialisées en développant notamment divers mécanismes de résistance. Cette évolution se traduit par :

- Le rôle pathogène plus important d'espèces naturellement résistantes aux nouvelles molécules.
- La dissémination de gènes de résistance connus chez certaines espèces à d'autres espèces auparavant sensibles ;
- L'émergence de nouveaux déterminants de résistance.

Les infections à bacilles à Gram négatif connaissent aujourd'hui une recrudescence préoccupante par leur gravité et la fréquence de la résistance de ces germes aux antibiotiques.

La surveillance de la sensibilité aux antibiotiques est une activité de routine pour le laboratoire de bactériologie. Il incombe au microbiologiste de fournir des informations sur l'état de la résistance bactérienne aux antibiotiques au niveau de chaque établissement.

Ceci a conduit à la mise sur pieds au niveau du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital A. Le DANTEC d'un programme de surveillance de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Nous avons déterminé la sensibilité de 213 souches bactériennes à 18 antibiotiques par la technique du E-Test® dont l'efficacité, la facilité et la reproductibilité ne sont plus à prouver.

Les résultats de cette étude ont montré :

### □ Pour les Enterobactéries

Parmi les bêtalactamines testées les plus efficaces sont la céfotaxime, la céfoxitine l'activité de l'amoxicilline est faible et la restauration de l'activité par l'association à l'acide clavulanique n'est pas obtenue dans la majorité des cas.

La Pipéracilline, le mécillinam et la céfalotine ont montré une faible activité.

L'efficacité des aminosides reste satisfaisante, les quinolones telle la



ciprofloxacine ont donné de bons taux d'inhibition. L'acide Nalidixique reste actif sur Enterobacter, *E. coli* et sur les Klebsielles.

□ **Pour *Pseudomonas aeruginosa*.**

La Ticarcilline seule ou en association avec l'acide clavulanique est peu active sur le bacille pyocyanique.

Parmi les bêtalactamines testées, la Ceftazidime, la Cefepime, l'Imipeneme ont donné par ordre décroissant les meilleurs résultats.

L'Aztreonam a montré une activité relative sur les souches testées.

Des aminosides ,l'Amikacine est la plus active et offre donc une alternative en antibiothérapie.

La Ciprofloxacine a donné de bons résultats et reste un antibiotique de choix pour le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa*.

Le but de notre travail était de surveiller la sensibilité de souches (de Klebsiella *Escherichia coli*, Enterobacter, Proteus, *Pseudomonas aeruginosa* ) de bacilles à Gram négatif isolées à Dakar.

Cette étude permet d'évaluer l'état actuel de la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques. Elle est indispensable pour informer les thérapeutes des risques d'échecs potentiels qu'entraîne l'utilisation de certains antibiotiques.

L'extrême plasticité de la résistance aux antibiotiques oblige le microbiologiste a détecter l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques, à suivre l'évolution de la sensibilité aux agents antibactériens et à faire appel à une utilisation plus raisonnée, plus justifiée, c'est à dire en définitive plus restreinte des antibiotiques.

Une politique de restriction dans l'utilisation des antibiotiques serait manifestement efficace pour diminuer leur pression de sélection.

Ceci demande de la part des pouvoirs politiques d'en afficher la volonté, mais aussi d'en donner les moyens financiers et humains pour éviter les infections nosocomiales.

**BIBLIOGRAPHIE****1 – Allouch Py, Labia R, Pina P., Morin E et le groupe multicentrique.**

Observatoires hospitaliers de la sensibilité de E- coli et de Klebsiella à l'association amoxicilline-acide clavulanique en 1994.

Méd. Mal. Infect, 1995 ; 25 : 934 –9

**2 – AMYES SGB**

The success of plasmid – encoded resistance genes in clinical bacteria. An examination of plasmid mediated ampicillin an trimethoprim resistance genes and their resistance mechanisms.

J. Med. Microbio. . 1989 , 28 : 73 – 83.

**3 – ANAGONOU S-Y. , ESLAHIPAZIRE J. , MAKOUTOBE , JOSSE R. ?  
MASSOUG BODJI .A., CADELER B. C.**

Sensibilité aux antibiotiques de bacilles à Gram négatif isolés d'infections urinaires au CHNU de Cotonou (BENIN) de Mars à Décembre 1992.

Bull. Soc Path. Ex., 87, 1994, 223-225.

**4 – Anagonou SY, Eslahpazire J, Makoulodé M, JOSSE R, MASSOUGBODJI  
A, SODELER BC.**

Sensibilité de 534 bacilles à Gram négatif isolées d'infections urinaires en médecine ambulatoire à Cotonou (BENIN)

Méd. Mal Infect 1995 ; 25 : 766 – 9

**5 – ARTHUR M. et al.**

Technique d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques.

L'antibiogramme mpe-videom, 1<sup>ère</sup> édition, Paris, 1985 : 251-305

**6 – B A M.**

Etude des Marqueurs épidémiologiques de souches de Pseudomonas aeruginosa isolés à Dakar.

Thèse Pharm. Dakar, 1993 : 77

**7 – Ba S.**

Phénotypage des souches de streptocoques sensibles aux aminosides  
Thèse Pharm,Dakar, 1995, N° 44.

**8 – BAUERNFEIND A.**

Classification of Bêta-Lactamases.  
Rev. Infect. Dis., 1986, 8 : suppl. 5,470-478.

**9 – BEN REJEB S., KAMOUN A.**

Surveillance de la sensibilité in vitro de différents pathogènes isolés de prélèvements trachéobronchiques, pus chirurgicaux, hémocultures, urines et d'isolats de *N. gonorrhoeae*.  
Médecine Digest, 1995, suppl. 4,24-31.

**10 – BERCHE P., GAILLART J-L, SIMONET M. :**

Structure, mode d'action des antibiotiques et mécanismes de la résistance bactérienne. In Bactériologie, Bactéries des infections humaines.  
Med. Science Flammarion, Paris, 5<sup>ème</sup> édition, 1989 ; 575-592

**11 – BERGER – BACHI B.**

Genetics of methicillin resistance in staphylococcus aureus.  
J. antimicrob. Chemother. ; 1989,23 : 671-680

**12 – BINGEN E.**

Mécanismes d'action des bêta-lactamines. In "Mécanismes d'action des bêta-lactamines : de la structure bactérienne à la structure de la molécule."  
Roussel, Nice, 1986, 31-46

**13 – BINGEN E.**

Différentes classification des céphalosporines. In "Mécanismes d'action des bêtalactamines : de la structure bactérienne à la structure de la molécule."  
Roussel, Nice, 1986, 31-46.

**14 – BINGEN E.**

Classification structurale des bêta- lactamines : de la structure bactérienne à la structure de la molécule.>>

Roussel , Nice , 1986 , 47 – 62.

**15 – BRYAN L.E.**

General mechanism of resistance to antibiotics Antimicrob.chemother. , 1989 ,23 : 817 – 823.

**16 – BUSH K.**

Characterization of bêtalactamases.

Antimicrob .Agents chemother, 1989, 33 : 259 – 263.

**17 – Carbonne A. , Jarlier V.,**

Entérobactéries et bêta lactamines.

Lecture interprétative de l'antibiogramme

Edition Roussel et Diamant, Paris, 1995, 1 – 16.

**18 – CHABBERT Y.A.**

L'antibiogramme sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.

Collections techniques de base .Edition de la Tourelle 1972, p 32

**19 - CHABBERT Y.A.**

Actualités pharmacologiques , 26ème série. Edition de la Tourelle 1972, p 32.

**20 – CHOPRA I.**

Mechanisms of resistance to antibiotics and other chemotherapeutic agents.

J.Appl. Bactériol., 1988 , symposium suppl. : 149 – 166

**21 – COLLATZ E ., GUTMANN L.,WILLIAMSON R., ACAR J.F.**

Developpement of resistance to third generation cephalosporins.

J.Antimicrob. Chemother., 1984,14b, 13 – 21.

**22 Courvalin P., Philippon A.**

Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens.

In Le Minor L., Veron M, éditions Bactériologie médicales 2<sup>ème</sup> édition, Paris Flammarion, 1989 : 332 – 55.

**23 – Cullmann W.**

L'introduction non spécifique : définition et conséquences.

Med. Mal. Infect., 1988 , H. serie , 24.

**24 DOSSO M.**

Etude de la sensibilité in vitro aux antibiotiques de différents isolats bactériens à Abidjan : résultats à propos de 90 souches.

Medecine Digest , 1995 , suppl. 4 , 32 – 38.

**25 Dublanchet A. , Burnat C.**

*Escherichia coli* dans un hôpital général de 1982 à 1993

Med. Mal. Infect 1994 ; 24 , spécial : 530 – 4

**26 Duval J.**

Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens.

In Le Minor L , Veron M, eds. Bactériologie médicale 2<sup>ème</sup> éd., Paris : Flammarion, 1989 : 273 – 96.

**27 FAYE I.**

Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar. Intérêt de l'utilisation de la technique du E. Test et du Programme Whonet III

Thèse Pharm., Dakar, 1997 , N° 07.

**28 FONTANA R.**

Penicillin binding proteins and the intrinsic resistance to betalactam in Gram positive cocci.

J.Antimicrob.Chemother., 1996, suppl.A,1-57

**29 Gabaston J. M., Charaki T., Mangeot J., et coll**

Phénotypes de résistance aux antibiotiques des germes les plus fréquemment isolés dans cinq centres hospitaliers spécialisés. Etude multicentrique.

Path. Biol. 1995 ; 43, N° 4 : 320 – 3.

**30 GODFREY A.J. , HATLELID L.H., BRYAN L.E.**

Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in betalactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* .

Antimicrob. Agents chemother, 1984 , 26 , 181 – 186.

**31 Goldstein F.W., GUTMANN L., William SouR. Et al**

In vitro emergence of simultaneous resistance to both betalactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*.

Ann.Microbiol. 1983,134,329-337

**32 GOULET V.**

Etude du relevé des bactéries isolées dans les hémocultures et les liquides céphalorachidiens par les laboratoires d'hôpitaux publics français en 1983.

Med. Mal. Inf. 1985; 15 :342 – 50

**33 CUTMANN L., Williamson R.,Moreau N. et al.**

Cross resistance to nalidixique acide, trimétoprime, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of klebsiella, *Enterobacter*, and *Serratia*.

J. Infect. Dis., 1985 , 151, 501 – 507

**34 HARTMANN B.J. , TOMAZA.**

Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents chemother , 1986, 29, 85 – 92

**35 Hayes M.V. , Ward J.B.**

The role of penicillin binding proteins in antibacterial activity of betalactam antibiotics.

In << antibiotics in laboratory medicine >>, Ed. V. Lorian , 1985, 722 –756.

**36 JA COBY G.A. et al.**

Properties of plasmid responsible for extended spectrum betalactamase production  
Antimicrob. Agents chemother , 1991 , 35, 164 – 169

**37 JAFFE A. , CHABBERT Y. A. , SEMONIN O.**

Role of porine proteins OmpF and OmpC in the permeation of betalactam  
Antimicrob. Agents Chemother , 1982, 22, 942 – 948

**38 Joffin J.N. , Leyral G.**

Antibiogramme : methodes des disques.

In. Microbiologie technique tome I. Dictionnaire des techniques, Bordeaux : centre régional de documentatation pédagogique, 1991 : 14 – 25

**39 JONES R.N.**

Betalactamase – mediated resistance in hospital pathogen University of Iowa, Ia, USA ( ) In 8<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infection diseases Lausanne, 1997 : 77

**40 KOULLA – SHIRO S. , ABONG – BWEND T.**

Surveillance de la sensibilité in vitro aux antibiotiques de différents pathogènes isolés de prélèvements trachéo-bronchiques, pus chirurgicaux, hémocultures et urines.

Médecine Digest, 1995 , suppl. 4, 55 – 65

**41 LABIA R.**

Bétalactamases inductibles et constitutives  
Med. Mal. Infect. 1988, hors série 11-34.

**42 LAURENT A, Berger J.P.**

Evolution des espèces bactériennes et de leur sensibilité aux antibiotiques dans le laboratoire d'un petit hôpital.

Revue médicale de la Suisse Romande 1996; 116 : 125 – 30.

**43 LEROY O. , BEUCAIRE G.**

Lutte contre la diffusion des infections à entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases << à spectre étendu >>.

Méd. Mal. Infect. 1996; 26 : 690 –7.

**44 LINDBREG F., NORMARKS S.**

Contribution of chromosomal betalactamase to betalactam resistance in Enterobacteria.

Rev.- Infect. Dis., 1986, 8 suppl.3, 292 –304.

**45 LIVERMORE D.M.**

Pouvoir inducteur des bêtalactamines : description et conséquences, mécanisme de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*.

Méd. Mal. Infect. 1988, H. série , 46-32

**46 Lyou DJ , Scheel O , Fung K. sc, Henrichse I. Cheng AFB.**

Increasing prevalence of multiresistant *Streptococcus* at Hong – Kong teaching hospital ( abstract 68 007 ). In 7<sup>th</sup> international congress for infections diseases, Hong Kong, 1996 : 172

**47 MALOUIN F. , Bryan L.E.**

Modification of penicillin binding proteins as mecanism of betalactam resistance.

Antimicrob. Agents Chemother ; 1986,30,1-5

**48 Maugein J., Perrier F., Cony makhoul P., Fourche J.;Darmaillac V.**

Activité in vitro de six bêtalactamines vis à vis de 295 souches d'entérobactéries et *P.aeruginosa* isolées chez des patients neutropeniques.

Path. Biol. Paris 1995 ; 43 (4) : 253 – 7



**49 Maurin M, Musso D., Charrel R et al.**

Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières. ( bacilles à Gram négatif aérobies ) situation 1992 à Marseille.

Méd. Mal. Infect. 1995; 25 : 508 –14

**50 MBOUP E.M.**

Sensibilité de bacilles à Gram négatif au CHU de FANN

Thèse Pharm. , 1996 , Dakar n° 75

**51 Miller G.**

Prevalence of local aminoglycoside resistance mechanism and their impact on the management of infections diseases.

In clinical Microbiology and Infection CMI 8<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and infections diseases May 25 –28 – 1997 : S41

**52 National Committee for Clinical Laboratory Standards.**

Developpment of in vitro susceptibility testing criteria and Quality Control Parameters. Tentative standard M23 – T. 1989

**53 National Committee for Clinical Laboratory Standards**

Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility tests. Third Edition  
Approved Standards M2 – A3 , vol. 4-1990

**54 National Committee for Clinical Laboratory Standards**

Reference Agar Dilution procedure for antimicrobial susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria.

Approved Standard M11 –A, Vol. 5 , N° 2-1990

**55 National Committee for Clinical Laboratory Standards**

Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for Bacteria Hat Grow Aerobically.

Approved standard M7 – A2 , Vol.5 , N° 22 – 1990.

**56 NDIAYE Kh. Y.**

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques et de la résistance par sécrétion de B-lactamases à spectre élargi de souches de bacilles à Gram négatif isolées au CHU de Dakar

Thèse Pharm. Dakar, 1992, N° 95

**57 NDOYE B. , Hugard I. Saccharin C.**

Bêta-Lactamases à spectre élargi : bilan sur un an à l'hôpital Principal de Dakar (1<sup>er</sup> février 1992 – 1<sup>er</sup> février 1993)

Dakar Médical 1993 ; 38,2.

**58 NIKAIDO H. , VAARA M.**

Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.

Microbiol. Rev., 1985, 49, 1-3

**59 NOUHOFF C., DELMEE M., STRUELEUS M.J.S.**

Multicenter survey of Escherichia coli resistant to ciprofloxacin : analysis of clonal diversity and Gyrase Mutation.

In C.M.I. 8<sup>th</sup> European Congress of clinical microbiology and infectious diseases.

May 25.28 – 1997. P 732

**60 ODUGBEMI T., ANIMASHAUN T., KESAH K.**

Une étude de la sensibilité antimicrobienne in vitro d'isolats bactériens cliniques à Lagos, Nigéria

Medicine Digest, 1995, suppl. 4, 39-54

**61 PECHERE J.C.**

Les spécificités de l'action antibactérienne des 7 méthoxyimino-céphèmes zivittérioniques , (« céphalosporines de 4<sup>e</sup> génération »)

Path .Biol. 1996 ; 4 N°2 : 99-105

**62 PHILIPON A. , Arlet G., Lagrange Ph.**

Fréquence de résistance et évolution à divers antibiotiques urinaires dont la Fosfomycine en milieu hospitalier (11816 souches, 1991-1995)

Méd. Mal. Infect. 1996 ; 26 : 539-41

**63 PHILLIPON A., Paul G., NEVOT P.**

Bêta-lactamases incidences et intérêt clinique

Rean. Soins. Intens. Med. Urg., 1987, 3 : 229 – 237

**64 PHILLIPON A. , Paul G., NEVOT P.**

Résistance plasmidique aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

Press.Med.1988,17 :1883-1889

**65 PHILLIPON A., Paul G., NEVOT P.**

Classification of Bêta-lactamases.

Med. Mal. Infect. 1989, hors série, 6-18

**66 PIDDOCK L. J. V., WISE R.**

Never mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in Gram negative bacteria.

J. Antimicrob. Chemother., 1985, 16, 279-284.

**67 PINCHON T. M., EMERIQUE P. et DEMANGE C.**

Consommation d'antibiotiques et profils de sensibilité de quelques micro-organismes dans un centre hospitalier général.

Méd. Mal. Infect 1993 ; 23 : 360-6

**68 RAHAL K.**

Sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées de prélèvements divers : résultats à propos de 111 isolats

Médecine Digest, 1995, suppl. 4 , 8-17

**69 REINER R.**

Antibiotics : an introduction , édition « Roche » , sc service, Basle, 1982.

**70 RICHMOND M.H. et SYKES R.B.**

in ROSE A.H. et TEMPEST D.W.(éd.) :

Advances in microbial physiology ;

Academic press,1973 , 9 : 31 – 88

**71 ROLINSON G. N.**

Betalactamase induction and resistance to betalactam antibiotics.

J. Antimicrob. Chemother. ,1989 , 23 : 1-5

**72 SANDERS C.C., SANDER Jr W.E., GOERING R.V., WERNER V.**

Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, betalactams, and aminoglycosides with special reference to cross resistance between unrelated drug classes.

Antimicrobiol. Agents Chemother. ,1984, 26, 797-801.

**73 SIROT J.**

«Resistance enzymatique des bacilles à Gram négatif aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ».

Méd. Mal. Infect., 1989, hors série Octobre : 24-30

**74 SPRATT B. G.**

Penicillin binding proteins and the future of betalactam antibiotics.

J. Gen. Microbiol ; 1983, 129,1247-1260

**75 SOUGAKOFF W. et al.**

The TEM-3 beta-lactamase, which hydrolized broad –spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two aminoacid substitutions.

FEMS Microbial. Lett., 1988 ,56, 343-348

**76 SY K. R.**

Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques.  
Données actuelles au CHU A. le Dantec de DAKAR.  
Thèse Pharm., Dakar , 1996, N°55

**77 THABAUT A.**

Résistance naturelle et résistance acquise des principales espèces bactériennes aux antibiotiques.  
Revue française des laboratoires, 1989, 194 : 55-6

**78 THABAUT A., AVRIL J. L. , BEBEAR C, BERGOGNE E et coll**

Evolution de la sensibilité des bacilles à Gram négatif à la ceftazidime et à trois autres beta-lactamines en milieu hospitalier de 1989 à 1993.  
Méd. Mal. Infect., 1995, 25, spécial : 6-19.

**79 THEN R.L.**

Ways to overcome cephalosporinase mediated betalactam resistance in *Enterobacter cloacae*  
Chemotherapia , 1985 , 1v ,83-89

**80 Weber Ph , Scoho M , Plaisance J-J et al.**

Activités in vitro de l'Amoxicilline et de l'association amoxicilline – acide clavulanique vis à vis d' *Escherichia coli* en médecine de ville.  
Méd. Mal. Infect. 1995 ; 25 : 593 – 8

**81 Williamson R.**

Resistance of *Clostridium perfringens* to betalactam antibiotic mediated by a decreased affinity of a single essential penicillin binding protein.  
J. Gen. Microbiol , 1983 , 129 , 2339 – 2342

# I

## PLAN

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

### 1<sup>ère</sup> Partie : Généralités

<b>I- GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>2</b>
---	----------

1-1- DEFINITION. ....	2
1-2- CLASSIFICATION .....	2
1-2-1- <i>β</i> -lactamines.....	2
1-2-2- Les aminosides .....	7
1-2-3- Macrolides, lincosamides, Streptogramines : (MLS).....	7
1-2-4- Les Cyclines.....	8
1-2-5- Les Phénicoles.....	8
1-2-6- les Quinolones .....	8
1-2-7- Les 5-nitro-imidazolés.....	8
1-2-8- Les Nitrofuranes.....	9
1-2-9- Les Sulfamides.....	9
1-2-10- Les 2-4 diaminopyrimidines .....	9
1-2-11- Associations sulfamides - diaminopyrimidines .....	9
1-2-12- Les antifoliques .....	9
1-2-13 Les Polypeptides.....	10

<b>II. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>10</b>
--	-----------

2.1. NOTION DE RESISTANCE.....	10
2.2. TYPES DE RESISTANCE .....	11
2.2.1. <i>Résistance naturelle</i> .....	11
2.2.2. <i>Résistance acquise</i> .....	11
2.2.3. <i>Résistance clinique</i> .....	11
2.3. SUPPORT GENETIQUE DE LA RESISTANCE.....	12
2.3.1. <i>Résistance chromosomique par mutation</i> .....	12
2.3.2. <i>Résistance par acquisition de gène</i> .....	31
2.3.3. <i>Résistance par dérégulation de gène</i> .....	54
2.4. MECANISMES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMES .....	71
2.4.1. <i>Résistance par production d'enzymes</i> .....	78
2.4.1.1. les $\beta$ -lactamases .....	1618
2.4.1.2. Les Estérases.....	1622
2.4.1.3. Les Amidases.....	1622

## II

2.4.2. Résistance non enzymatiques aux $\beta$ -lactamines.....	1622
2.4.2.1. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram positif.....	1622
2.4.2.2. Résistances non enzymatiques chez les bactéries à Gram négatif .....	1623
2-5- RESISTANCE AUX AMINOSIDES .....	1625
2-5-1- Résistance naturelle .....	1625
2-5-2- Résistance acquise.....	1625
2-5-3- Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR).....	1627
2-6- RESISTANCE AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES, STREPTOGRAMINES .....	1628
2-6-1- Résistance acquise.....	1628
2-7- RESISTANCE AUX QUINOLONES .....	1629
2-8- RESISTANCE AUX CYCLINES .....	1629
2-9- RESISTANCE AUX PHENICOLES .....	1629
2-10- RESISTANCE VIS A VIS DES SULFAMIDES ET DU TRIMETHOPRIME .....	1630
2-10-1- Résistance naturelle : .....	1630
2-10-2- Résistance acquise : .....	1630
<b>III- METHODES DE DETERMINATION IN-VITRO DES CMI .....</b>	<b>1632</b>
3.1- DEFINITION DE LA CMI .....	1632
3.2.- METHODE PAR DILUTION .....	1632
3.2.1.- Méthode par dilution en milieu liquide.....	1632
3.2.2.- Méthode par dilution en milieu solide .....	1632
3.3. METHODE PAR DIFFUSION ( ANTIBIOGRAMME: METHODE DES DISQUES) .....	1633
3.4. MICROMETHODES D'ETUDE "IN VITRO" DE LA SENSIBILITE DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES .....	1633
3.5. LE E-TEST <sup>®</sup> (EPSILLOMETER-TEST).....	1633
<b>IV : LECTURE INTERPRETATIVE DE L'ANTIBIOGRAMME.....</b>	<b>1634</b>

## 2<sup>ème</sup> Partie : Travail Personnel

<b>II MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>1638</b>
2.1. SOUCHES BACTERIENNES .....	1638
2.1.1. Souches à tester.....	1638
2.1.2. Souches de référence.....	1639
2.2. MATERIEL ET REACTIFS .....	1639
2.2.1. Réidentification des souches bactériennes.....	1639
2.2.2 - Matériel pour le E-test.....	1639
2.2.3. Détection des $\beta$ -lactamases.....	1640
2.2.4. Matériel pour la conservation.....	1640

### III

2.2.5. Matériel pour l'analyse des résultats .....	1640
2.3. METHODES.....	1640
2.3.1. Méthode détermination de la sensibilité par E-test® .....	1640
2.3.1.1. Préparation de l'inoculum .....	1641
2.3.1.2. Inoculation .....	1642
2.3.1.3. Application des bandes .....	1642
2.3.1.4. Incubation .....	1642
2.3.1.5. Lecture .....	1642
2.3.1.6. Contrôle de qualité.....	1643
2.3.2. Méthodes de détection des $\beta$ -lactamases : .....	1643
2.3.2.1. Méthode à la céfinase .....	1643
<b>III- RESULTATS.....</b>	<b>1644</b>
3-1- RESULTATS GLOBAUX.....	1644
3-1-1- Résultats de la sensibilité aux $\beta$ -lactamines .....	1644
3-1-2- Résultats de la sensibilité aux autres antibiotiques testés.....	1646
3-1-3- Résultats de la détection des $\beta$ -lactamases : .....	1651
3-1-4- Résultats du phénotypage.....	1652
3-2- RESULTATS DE LA SENSIBILITE EN FONCTION DES PRODUITS PATHOLOGIQUES.....	1652
3-2-1- Sensibilité des souches isolées d'urines des malades hospitalisés. ....	1652
3-2-1-1- Sensibilité de <i>Proteus mirabilis</i> . ....	1652
3-2-1-3- Sensibilité de <i>Escherichia coli</i> .....	1654
3-2-1-4- Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1654
3-2-2- Sensibilité de souches isolées d'Hémoculture.....	1657
3-2-2-1- Sensibilité des souches de <i>Escherichia coli</i> isolées d'Hémoculture de malades hospitalisés .....	1657
3-2-2-2- Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1657
3-2-2-3- Sensibilité des souches d' <i>Enterobacter</i> spp .....	1657
3-2-3- Résultats de la sensibilité des souches isolées de Pus de malades Hospitalisés. ....	1660
3-2-3-1- Sensibilité de <i>Escherichia coli</i> . ....	1660
3-2-3-2- Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1660
3-2-3-3- Sensibilité d' <i>Enterobacter</i> spp ( Tableau XXIV).....	1660
3-2-3-4- Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( Tableau XXV).....	1663
3-2-4- Comparaison des profils de sensibilité entre les souches provenant d'hospitalisés et de malades externes.....	1663
3-2-4-1- Sensibilité de <i>Escherichia coli</i> .....	1663
3-2-4-2- Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1663
3-2-4-3- Sensibilité de <i>Proteus mirabilis</i> .....	1663



## IV

3-2-4-4- Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1664
<b>IV- DISCUSSION.....</b>	<b>1671</b>
4 –1 ETUDE DE LA SENSIBILITE EN FONCTION DES GERMES. ....	1671
4.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	1671
4.1.1.1. Les Bêta-lactamines. ....	1671
4.1.1.2. sensibilité aux aminosides. ....	1672
4.1.1.3. Sensibilité aux quinolones. ....	1672
4-1-1-4- Sensibilité au Cotrimoxazole.....	1673
4.1.2. Sensibilité de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1673
4.1.2.1. Les Bétalactamines .....	1673
4.1.2.2. Les Aminosides. ....	1674
4.1.2.3. Les Quinolones. ....	1674
4.1.2.4. L'association Triméthoprimé –Sulfaméthoxazole.....	1674
4.1.3. <i>Proteus mirabilis</i> .....	1675
4.1.3.1 Les bétalactamines.....	1675
4.1.3.2. Les aminosides.....	1675
4.1.3.3. Les quinolones .....	1676
4.1.3.4.L'association Triméthoprimé –Sulfaméthoxazole.....	1676
4.1.4. <i>Enterobacter spp</i> .....	1676
4.1.4.1. Les Bétalactamines. ....	1676
4.1.4.2. Les aminosides.....	1677
4.1.4.3 Les quinolones. ....	1677
4.1.4.4. L'association Triméthoprimé-sulfaméthoxazole. ....	1677
4.1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1677
4.1.5.1. Les Bétalactamines. ....	1677
4.1.5.2. Les aminosides.....	1678
4.1.5.3. Les quinolones. ....	1678
4-2- COMPARAISON DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES D'HOSPITALISES AVEC CELLES DE MALADES EXTERNES. ....	1679
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>1680</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>1682</b>