REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Département de sciences et nature de vie



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master Académique**

Spécialité :

Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

-Benameur Hanane.

-Bellatrache Imane.

-Mouffok Souâd.

Thème :

Étude sur les biofilms bactériens et les mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Les membres de jury :

Promotrice	Mme. BELKACEM Imane	M.C.B	UYFM
Examinatrice1	Mme. ZERGOUG Amina	M.C.B	UYFM
Examinatrice2	Mme. SIOUDA Wafae	M.C.B	UYFM

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans le bon ***Dieu*** *tout puissant qui nous guidés sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté de continuer et de terminer nos études.*

Nos vifs remerciements s'adressent à notre ***promotrice Mme.Belkacem Imane****, de nous avoir acceptés nous encadrer, ainsi que pour son aide précieuse et ses considérable conseils qui nous ont facilité le travail.*

Nos remerciements sont adressés également aux ***membres du jury*** *qui ont consacré un peu de leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.*

Nos profonds remerciements vont également à tous les ***enseignants*** *du département des sciences de la nature et de la vie et particulièrement ceux de la spécialité de microbiologie appliquée qui ont veillé à notre formation et qui ont améliores nos connaissance.*

Sans oublier ***la promotion*** *microbiologie appliquée de 2020/2021.*

En fin, nous remercions tous ceux qui nous aidé de loin ou de pré pour l'élaboration de ce travail une énorme.

Merci à ***nos parents*** *pour leurs soutiens, leur encouragement et leurs patiences durant ces années d'études.*

Dédicaces

*Grace à **Dieu** tout clément et miséricordieux qui m'a tracé la route, et ma donnée le pouvoir, et le courage de continuer jusqu'à la fin, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :*

*A MES TRES CHERS PARENTS **BOUDJEMAA** et **MALIKA***

Qui m'ont toujours guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, mon père, l'homme de ma vie qui a toujours sacrifié toute sa vie afin de me voir réussir, et ma mère la lumière de mes jours, qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, que ce travail soit le fruit de vos innombrables sacrifices merci mes parents je vous aime.

A Mme BELKACEM IMANE

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand respect et ma profonde estime. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour nous, que Dieu vos garde.

*A mes chères sœurs **NESRINE** et **YASMINE**, et mon seul cher frère **RAYANE** pour leur encouragement et leur soutien moral, merci d'être là.*

*A toute la famille **BENAMEUR** et la famille **OUNNAS** son exception et mes proches tous ceux qui nous souhaitent bonne chance*

*Mes meilleures amies **FATIHA**, **CHAIMA**, **NESRINE**.*

*A mes chères trinôme **SOUAD** et **IMANE**.*

A tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom

A tous mes enseignants et mes collègues de spécialité microbiologie appliquée.

Hanane.

Dédicaces

Tout d'abord je remercie ***ALLAH*** *de m'avoir accordé le courage, la patience, la santé pour réaliser et mener à bien ce travail.*

Je dédie ce modeste travail :

A ***mon père****, il n'y a aucune dédicace qui puisse exprimer l'amour, et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Cet humble travail est le fruit de tous les sacrifices que j'ai consentis pour mon éduction et ma formation je t'aime papa et supplie dieu de t'accorder une bonne santé.*

A ***ma chère mère****, tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

A mon seul frère ***AYOUB****, mon bras droit, ma chère et fidèle sœur* ***FELLA*** *et son mari* ***RIDA****, et ma petite sœur* ***NOUR ALHOUDA****, qui sont la source de mon inspiration et de mon courage.*

A mes chers neveux, ***NAZIM****,* ***ABD ALMOAIZ*** *et* ***REZLAN****.*

A tous mes enseignants et mes amis, mes collègues de spécialité microbiologie appliquée, et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ma formation.

A tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.

Imane.

Dédicaces

Avant tout je remercie ***Allah*** *d'avoir atteint ce stade*

Avec tous mes sentiments je dédie ce travail à :

A mes parents ***Mahmoud*** *et* ***Zohra***

En témoignage de leur amour et soutien, encouragements et leurs grands sacrifices.

Que dieu les préserve en bonne santé et leur accorde longue vie.

A mes ***frères*** *et* ***sœurs****.*

*A toute ma famille (****moufak*** *et* ***hammami****) chacun par son nom son exception.*

Je remercie mon promotrice ***Mme Belkacem Imane*** *et tous ce qui m'ont aidé dans ce travail.*

A mes chères trinôme ***Hanane*** *et* ***Imane***

A tous mes enseignants et mes collègues de spécialité microbiologie appliquée.

.

Souâd.

Résumé :

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique et attachées à une surface. Le biofilm protège les bactéries

et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. La résistance aux antibiotiques correspond au fait qu'un traitement antibiotique ne soit plus efficace sur une infection bactérienne. La résistance aux antibiotique peut être naturelle ou acquise, deux grands mécanismes de résistance soit mécanismes génétique par mutations chromosomiques et de l'intégration de petits brins d'ADN circulaires qui se transmettent de bactérie à bactérie (les plasmides), soit mécanismes biochimique qui font appel à plusieurs mécanismes : production d'une enzyme inhibant l'antibiotique, imperméabilisation de la membrane de la bactérie, modification de la cible de l'antibiotique. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes.

L'étude a porté sur l'identification des souches de *Pseudomonas* basée sur leurs caractères culturaux et biochimiques, sur l'étude de leur résistance aux antibiotiques.

L'identification phénotypique a révélé la présence de *Pseudomonas aeruginosa*. La lecture et l'interprétation des antibiogrammes montrent que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont une résistance totale à la colistine, la ceftazidime et à la céfazoline (100%) suivi par une résistance importante à la vancomycine et au chloramphénicol (75%).

Les mots clés : Biofilm, Résistance aux antibiotiques, *Pseudomonas aeroginosa.*

الملخص:

الأغشية الحيوية البكتيرية هي مجموعات منظمة من الخلايا البكتيرية المغلفة بمصفوفة بوليمرية وتعلق على سطح الغشاء الحيوي يحمي البكتيريا ويسمح لهم بالبقاء في ظروف بيئية معادية. تشير مقاومة المضادات الحيوية إلى حقيقة أن العلاج بالمضادات الحيوية لم يعد فعالا في العدوى البكتيرية. يمكن أن تكون مقاومة المضادات الحيوية طبيعية أو مكتسبة، هناك آليتين رئيسيتين للمقاومة إما الآليات الوراثية عن طريق الطفرات الصبغية وتكامل خيوط الحمض النووي الدائرية الصغيرة التي تنتقل من البكتيريا إلى البكتيريا (البلازميدات) ، أو الأليات البيوكيميائية التي تستدعي عدة آليات : إنتاج إنزيم يثبط المضادات الحيوية ، تسرب المياه من غشاء البكتيريا ، تعديل الهدف من المضادات الحيوية. يمكن للبكتيريا الغشاء الحيوي مقاومة الاستجابة المناعية للمضيف وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية من الخلايا البكتيرية العوالق. يتم التعرف الآن على القدرة على تشكيل غشاء حيوي كخاصية مميزة للعديد من الكائنات الحية الدقيقة

ركزت الدراسة على تحديد سلالات الزائفة على أساس خصائصها الثقافية والكيميائية الحيوية، على دراسة مقاومتها للمضادات الحيوية. كشف تحديد النمط الظاهري عن وجود الزائفة الزنجارية. تظهر قراءة وتفسير المضادات الحيوية أن سلالات الزائفة الزنجارية لديها مقاومة كلية للكوليستين والسيفتازيديم والسيفازولين (100%) تليها مقاومة كبيرة للفانكومايسين والكلورامفينيكول (75%). |

الكلمات الرئيسية: الأغشية الحيوية ، مقاومة المضادات الحيوية ، الزائفة الزنجارية

Abstract :

Bacterial biofilms are structured clusters of bacterial cells coated with a polymeric matrix and attached to a surface. Biofilm protects bacteria and allows them to survive in hostile environmental conditions. Antibiotic resistance refers to the fact that antibiotic treatment is no longer effective on a bacterial infection. Resistance to antibiotics can benatural or acquired, two main mechanisms of resistance either genetic mechanisms by chromosomal mutations and the integration of small circular DNA strands that are transmitted from bacterium to bacterium (plasmids), or biochemical mechanisms that call on several mechanisms: production of an enzyme inhibiting the antibiotic, waterproofing of the membrane of the bacterium, modification of the target of the antibiotic.. Biofilm bacteria can resist the host's immune response and are much more resistant to antibiotics than planktonic bacterial cells. The ability to form a biofilm is now recognized as a characteristic peculiar to several microorganisms.

The study focused on the identification of *Pseudomonas* strains based on their culturaland biochemical characteristics, on the study of their resistance to antibiotics.

Phenotypic identification revealed the presence of *Pseudomonas aeruginosa.* The reading and interpretation of the antibiograms show that *Pseudomonas aeruginosa* strains have total resistance to colistin, ceftazidime and cefazoline (100%) followed by significant resistance to vancomycin and chloramphenicol (75%).

Key words: Biofilm, Antibiotic Resistance, *Pseudomonas aeroginosa.*

Table des matières

Liste des figures Liste

des tableaux Liste des

abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Les biofilms bactériennes

1. Historique 3
2. Qu'est-ce qu'un biofilm.....3
3. Etape de formation de biofilm 5
4. Nature homogène ou hétérogène de biofilm 6
5. Composition de la matrice du biofilm..... 6
6. Les facteurs de mobilité et d'adhérence 7
7. Comment étudie-t-on les biofilms bactériens au laboratoire ?..... 8
8. un modèle d'étude : *Pseudomonas Aeroginosa*..... 9
9. Les biofilm et l'homme 10
10. Exposition à des concentrations sous-inhibitrice d'antibiotique 11
11. Tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants 12

Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques

1. Rappel historique..... 13
2. Définition..... 14
3. Critères de classification des antibiotiques..... 14

3.1. L'origine 14

3.2. Le mode d'action 14

3.3. Le spectre d'activité.....16

3.4. Structure chimique..... 17

4. Principales classes et familles d'antibiotiques 17
5. Critères d'efficacité et d'activité d'un antibiotique..... 26
6. Les paramètres d'activité d'un Antibiotique 27

7.1. Spectre d'activité 27

7.2. Bactériostatique et bactéricide..... 27

7. Pharmacocinétique des Antibiotiques 30

8.1. Absorption 30

8.2. Distribution 31

8.3. Transformation.....31

8.4. Elimination.....31

Table des matières

Chapitre III : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

1. Résistance aux antibiotiques 32
1.1. Définition de la résistance 32
1.2. Types de résistances 32
1.2.1. Résistance naturell 32
1.2.2. Résistance acquise 32
2. Mécanismes de résistance 33
2.1. Mécanismes génétique 33
2.1.1. La résistance chromosomique 33
2.1.2. La résistance extra chromosomique (plasmides) 33
2.1.3. Le phénomène de tolérance aux antibiotiques 33
2.2. Mécanisme biochimique 33
2.2.1. Modification de la cible 34
2.2.2. Inactivation enzymatique de l'antibiotique 35
2.2.3. Diminution de la perméabilité 35
3. Excrétion de l'antibiotique par mécanisme d'efflux 36
4. Résistance aux antibiotiques par développement de biofilms 37
5. Persistance des bactéries 37
6. les mécanismes de résistances découverts récemment 38
6.1. La métallo-β-lactamase NDM-1… 38
6.2. Mycobactérium smegmatis et le mécanisme de persistance dynamique 39
7. La réponse SOS bactérienne : une voie efficace d'acquisition de résistance aux antibiotiques 40
8. La lutte contre l'antibio-résistance 42
8.1. Réduire la consommation d'antibiotique 42
8.1.1Surveillance de la consommation d'antibiotique et de la résistance bactérienne 43
8.2. Hygiène, prévention des infections, et lutte contre les infections nosocomiales 45
8.2.1. La lutte contre les infections nosocomiales 45
8.3. Dans le domaine vétérinaire 47
8.4. La phagothérapie 47
8.4.1. Définition 47
8.4.2. Avantages de la phagothérapie 48

La partie expérimentale

Table des matières

1. Prélèvement 49
1.1. Technique de prélèvement 49
2. Isolement et identification 49
2.1. Méthodologie 49
2.1.1. Isolement et identification phénotypique des souches bactériennes 49
2.1.2. Identification phénotypique des souches bactériennes 51
2.1.2.1. Identification morphologique 51
2.1.2.2. Recherche des enzymes respiratoires 52
2.1.2.3. Recherche des pigments 53
2.1.2.4. Biotypage par microgalerie API 53
3. Conservation des souches bactériennes 54
4. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of Flight Mass Spectrometry method) 54
5. Détermination des cinétiques d'adhésion bactériennes par le biofilm Ring Test 54
6. Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet 55
7. Imagerie cellulaire 56
7.1. Microscope à épifluorescence 56
7.2. Traitement des images 56
8. Etude de la résistance aux antibiotiques 56
8.1. Technique de l'antibiogramme 56
8.2. Antibiotiques testés 57
9. Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides 58
9.1. La tobramycine et l'amikacine retardent l'adhésion et la formation de microcolonies dans l'isolat de fibrose kystique de *Pseudomonas aeruginosa* 58
10. L'antibiofilmogramme ou l'évaluation de l'effet des antibiotiques sur la formation du biofilm bactérien 59
11. Induction de la formation de biofilm par les βlactamine 59
11.1. *P. aeruginosa* Antibiofilmogram révèle le rôle du β-lactame 59
12. Isolement et identification phénotypique des isolats bactériens 61
12.1. Identification morphologique 61
12.2. Enzymes respiratoires 62
12.3. Recherche des pigments de *Pseudomonas* 62
12.4. Biotypage par microgalerie API 62
12.5. MALDI-TOF MS 64

Table des matières

12.6. Détermination des cinétiques d'adhésion bactériennes par le biofilm ring test. 64
12.7. Etude de la résistance aux antibiotiques (*Pseudomonas*) 65
12.8. Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides 66
12.9. Induction de la formation de biofilm par les β-lactamines 66
13. Discussion 68
Conclusion
Références
Annexe

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes de formation de biofilm **(Ren D et al, 2004) .....** 5
Figure 2 : Docteur ALEXANDER FLEMING **(Alexander Fleming (1881-1955).....** 13
Figure 3 : Mécanisme d'action des antibiotiques sur la bactérie **(Mevius et al.1999 ; Oxoby, 2002).....** 16
Figure 4 : Beta-lactamines (pénicillines-céphalosporines) **(Cavallo et al, 2004 ; Ruppé, 2010) .....** 18
Figure 5 : Structure de base des aminosides **(Vakulenko et Mobashery, 2003) .....** 21
Figure 6 : Structure de base des quinolones **(Andriole, 2005).....** 23
Figure 7 : Erythromycine, chef de file des macrolides **(pharmacorama, érythromycine, 2019) .....** 25
Figure 8 : Structure de base des cyclines **(sciencedirect.com, cycline antibiotiques, 2019) .....** 26
Figure 9 : Détermination de la CMI sur milieu liquide **(Anonyme 1, 2012) .....** 28
Figure 10 : Détermination de la CMI sur milieu solide **(Anonyme 1, 2012).....** 28
Figure 11 : Antibiogramme **(Haute garonne.gouv, Visite sanitaire, 2019).....** 29
Figure 12 : Effet bactéricide concentration-dépendant, temps-dépendant **(Chast F, Rev Fr Lab;2004).....** 30
Figure 13 : Les mécanismes de résistances aux antibiotiques 34
Figure 14: Le mécanisme de résistance aux ATBs par la modification des PLP au niveau de la bactérie **(Bevilacqua S, 2011) .....** 34
Figure 15 : L'action des enzymes ß-lactamase sur les ATBs agissant sur la bactérienne **(Morelière M, 2000 à 2009) .....** 35
Figure 16 : Le mécanisme de résistance par modification des porines de la membrane bactérienne **(al, 2016) .....** 36
Figure 17 : Le mécanisme d'efflux exercé par la bactérie sur l'antibiotique **(A. Philippon et al, 2010).....** 37

Liste des figures

Figure 18 : Isolement et identification des souches de *Pseudomonas* **(Larpent, 1997)**...50

Figure 19 : Technologie du Biofilm Ring Test **(Chavant et al, 2007) .....** 55

Figure 20 : (a) Aspects macroscopiques et (b) microscopiques de certains isolats bactériens 61

Figure 21 : Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens 62

Figure 22 : Antibiogramme des différents isolats de *Pseudomonas*..... 63

Liste des tableaux

Tableau 01 : Recherche des enzymes respiratoires 52

Tableau 02 : Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes **(IPP, 1981) . .** 58

Tableau 03: Aspects macroscopiques et microscopiques des *Pseudomonas* isolés à partir de l'environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma 61

Tableau 04 : Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens..... 62

Tableau 05 : Profils biochimiques des isolats bactériens sur les galeries miniaturisées API 63

Tableau 06 : *Pseudomonas* isolés à partir de l'environnement des établissements publics hospitaliers de la région de Guelma.....64

Tableau 07 : Score d'identification des bactéries 64

Tableau 08 : Profils antibiotypiques associés aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* 65

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire.

AI : Auto-inducteur.

AME : Aminoglycoside Modifying Enzyme (Enzyme modifiant les aminoglycosides).

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament.

API : Analytical profile index) Index du profil analytique).

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messager.

ATB : Antibiotique.

BFI : Indice biofilm.

bla : Gène codant une β-lactamase

BLAST : Basic local alignement search too (Recherche d'alignement locale de base aussi).

BLSE : β-lactamase à spectre étendu.

BMR : Bactérie multi-résistante.

BRT : Biofilm ring test.

C1G : Céphalosporine de première génération.

C2G : Céphalosporine de deuxième génération

C3G : Céphalosporine de troisième génération

C4G : Céphalosporine de quatrième génération

CCLIN : Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales.

CHU : Centre Hospitalier Universitaire.

Liste des abréviations

CIN : Comité de lutte contre les infections nosocomiales.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CNAMTS : Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés.

CTIN : Comité technique national des infections nosocomiales.

CV : Cristal violet.

DD-TEST : Double disc synergie test.

DDJ : Dose définie journalière.

DHFR : Dihydrofolate-réductase.

DHPS : Dihydropteroate-synthétase.

DNase I : désoxyribonucléase I

DOS : 2-Désoxystreptamine.

EARS-NET : European antimicrobial résistance surveillance network (Réseau européen de surveillance de la résistance antimicrobienne).

ECDC : European centre for disease prévention and control (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies).

ECP : Electrophorèse en champ pulsé.

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique.

EPPI : Eau pour préparation injectable.

FDA : Food and drug administration (Administration des aliments et des médicaments).

I : Intermédiaire.

ICE : Intégrative and conjugative élément.

LCR : Liquide céphalorachidien.

LPS : Lipopolysaccharid.

Liste des abréviations

MEM : Méropénème.

MH : Mueller Hinton.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PAB : Para-amino-benzoïque.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

PER: Pseudomonas Extended Résistance.

PGA : Poly β-1, 6-N-acétylglucosamine.

PLPs : Protéine liant les pénicillines.

QS : Quorum sensing.

R : Résistantes.

RAISIN : Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales.

RT-PCR : Reserve transcriptase-polymérase Chain réaction.

S : Sensibles.

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline.

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise.

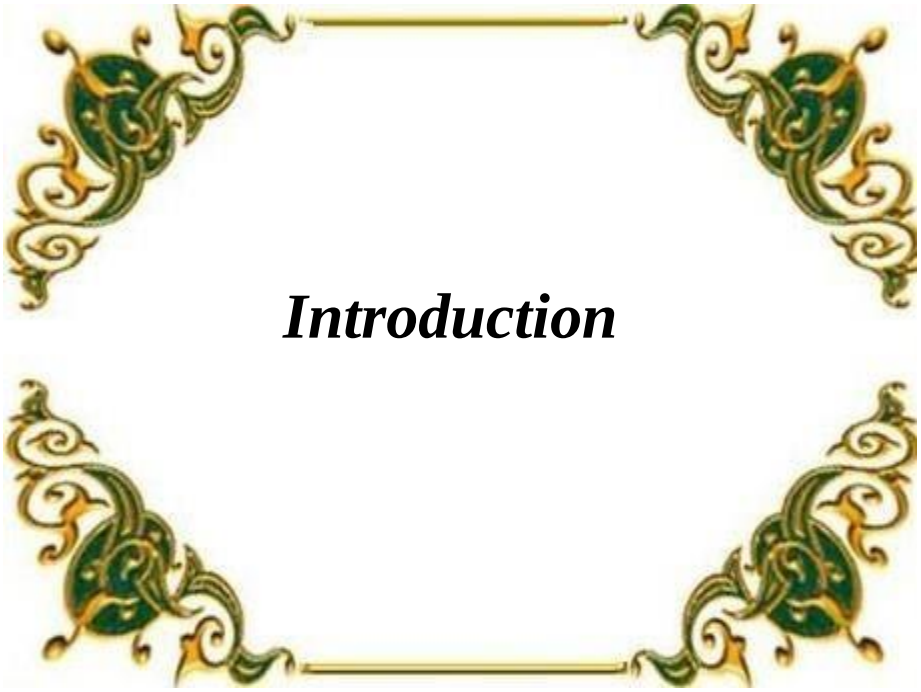
SHV: Sulfhydryl reagent Variable.

TEM: Temoneira : nom du patient.

TROD : Tests rapides d'orientation diagnostique.

UV : Ultra-violet.

VEB: Vietnam Extended-Spectrum β-lactamase (Vietnam B-lactamase à spectre étendu).



Introduction

Introduction

Depuis la découverte des biofilms, la vision des biologistes sur le monde microbien a radicalement changé. En effet, les micro-organismes (bactéries, archées, champignons, protistes, virus...) et, plus particulièrement, les bactéries, ont été pendant longtemps uniquement considérés comme existant sous une forme dite «planctonique», c'est-à-dire en suspension dans l'eau. Or, la vie microbienne de notre planète a colonisé non seulement les milieux aqueux mais également tous les milieux solides. Il est donc rare de trouver des surfaces totalement dépourvues de microbes, autre nom des micro-organismes. On estime d'ailleurs que 80% de la masse microbienne sur terre existe sous une forme adhérée pouvant potentiellement donner naissance à un biofilm. Sachant que les micro-organismes représentent plus de 90% des espèces et 60% de la biomasse sur terre, cela place les biofilms comme le mode de vie principal sur la planète. Dans la nature, les biofilms ont été observés dans des niches écologiques aussi variées que la surface des plantes, les sols, les interfaces air-eaux stagnantes, les sédiments marins, la peau, etc. La plupart du temps, ces biofilms naturels comportent plusieurs espèces. Tous les biofilms ont pour point commun une cohésion des cellules assurée grâce à une matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de polymères complexes (souvent dérivés de polysaccharides), d'eau et quelquefois de protéines et d'acides nucléiques. Elle constitue un véritable rempart protecteur contre l'environnement souvent hostile et confère au biofilm des propriétés de matière solide. Les exemples de biofilms « bénéfiques » sont pléthore. Au contraire, lorsqu'une bactérie pathogène se développe en biofilm, elle devient plus résistante aux traitements antibiotiques et elle est capable de coloniser facilement des implants médicaux, ce qui représente la cause principale des infections nosocomiales.

La résistance aux antibiotiques s'est progressivement développée et concerne aujourd'hui l'ensemble des bactéries pathogènes. Elle résulte de l'administration répétée d'antibiotiques chez l'homme ou l'animal qui crée des conditions favorisant l'acquisition et la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques. La résistance des biofilms aux antibiotiques est augmentée par rapport à ce qui est normalement observé avec les cellules planctoniques.

Pseudomonas aeruginosa présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre restreint. Les résistances acquises pour ces antibiotiques sont cependant très fréquentes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance liés à des mutations chromosomiques et à

l'acquisition de gènes exogènes. Ce pathogène opportuniste est caractérisé par sa capacité à persister et à résister au niveau de l'environnement hospitalier,ou se trouvent réunies toutes les conditions favorables à son émergence et dissémination, et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques, aboutissant rapidement à une impasse thérapeutique, expliquant ainsi les taux de résistance constatés dans de nombreux pays du bassin méditerranéen.

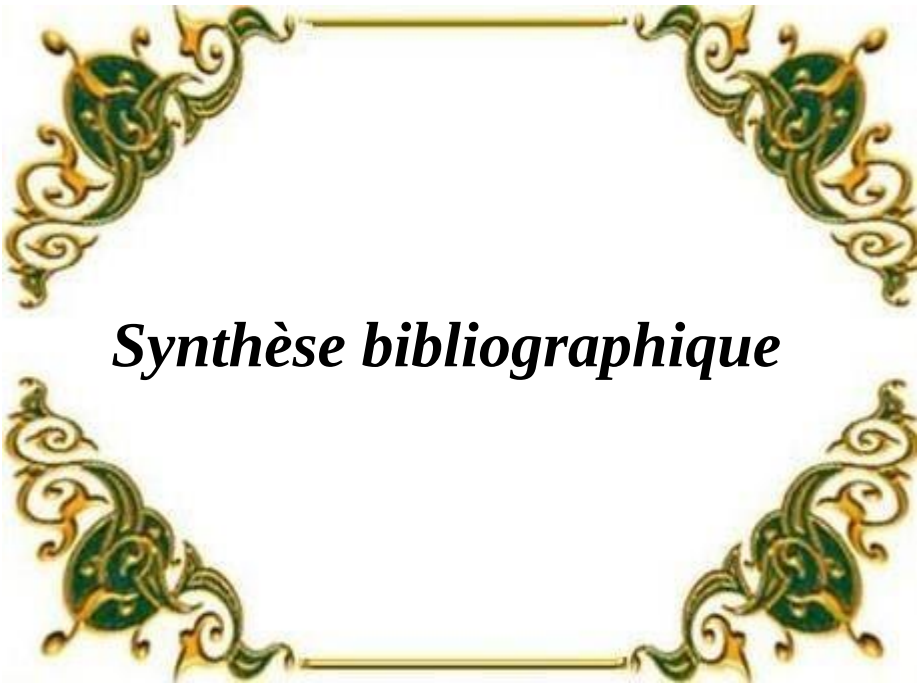
L'objectif de ce travail est de connaître les différents mécanismes de résistance des biofilms bactériens aux antibiotiques, pour cela les chapitres:

*Chapitre I : nous avons parlé des biofilms bactériens.

*Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques

*Chapitre III : contient les différents mécanismes de résistance des biofilms bactériens aux antibiotiques, Et les moyens de lutter contre la résistance aux antibiotiques.

*Chapitre IV : La partie expérimentale : contient le matériel et la méthode, Résultats et discussion.



Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les biofilms bactériennes

1. Historique :

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVIIe siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. Bien que d'abord identifiés fixés sur un support solide, ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées ; dès lors, l'essentiel des connaissances acquises résulte de travaux principalement réalisés sur ces formes, cultivées dans des milieux nutritifs liquides et agités. Quelques travaux attirent cependant l'attention sur les interactions existant entre les micro-organismes et les surfaces.

En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de micro-organismes qui s'épaissit progressivement **(Henrici, 1933).** En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension **(Zobell, 1943).** Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms.

2. Qu'est-ce qu'un biofilm :

A. Le biofilm correspond à un environnement physiquement structuré L'utilisation de la microscopie optique, puis convocable, a permis de montrer que le biofilm est composé d'agrégats de micro-organismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux ; véritables « canaux », ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation **(Lawrence et al.,1991).** Ainsi, le biofilm n'est-il pas un milieu homogène, mais un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les micro-organismes qui le composent et les conditions environnementales **(Stoodley, Debeer et Lewandowski, 1994; Sutherland, 2001).**

B. La matrice extracellulaire est une caractéristique de nombreux biofilms Le développement de l'architecture des biofilms bactériennes est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autre que les micro-organismes. Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques secrétés par les micro-organismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides **(Sutherland, 2001).**

C. Le biofilm est un environnement hétérogène.

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Ainsi, contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneursvariables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments **(Costerton et al, 1994).** Le biofilm est un environnement hétérogène. Le développement tridimensionnel du biofilm condalement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments Cette hétérogénéité physico-chimique s'accompagne d'une hétérogénéité métabolique, source de microenvironnements qui permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires. Il en résulte une répartition biologique organisée de nombreux micro- organismes dans le biofilm où peuvent cohabité bactéries, champignons, algues et protozoaires.

D. Les bactéries du biofilm possèdent des propriétés spécifiques. La notion de biofilm recouvre donc des formations biologiques assez différentes et souvent très complexes, associant haute densité bactérienne, production de matrice et croissance sur une surface. De nombreux travaux ont montré que la formation d'un biofilminduit une expression différentielle des gènes, comparée à celle des bactéries planctoniques**(Whi.Teley et al, 2001); (Beloin et Ghigo, 2005).**

Il faut également ajouter que l'ensemble des caractéristiques structurales et physicochimiques du biofilm confère aux bactéries qui le composent, des propriétés spécifiques de morphologie, de croissance, de communication entre les cellules et de résistances aux biocides, distinctes de celles des bactéries planctonique.

3. Étapes de formation de biofilm :

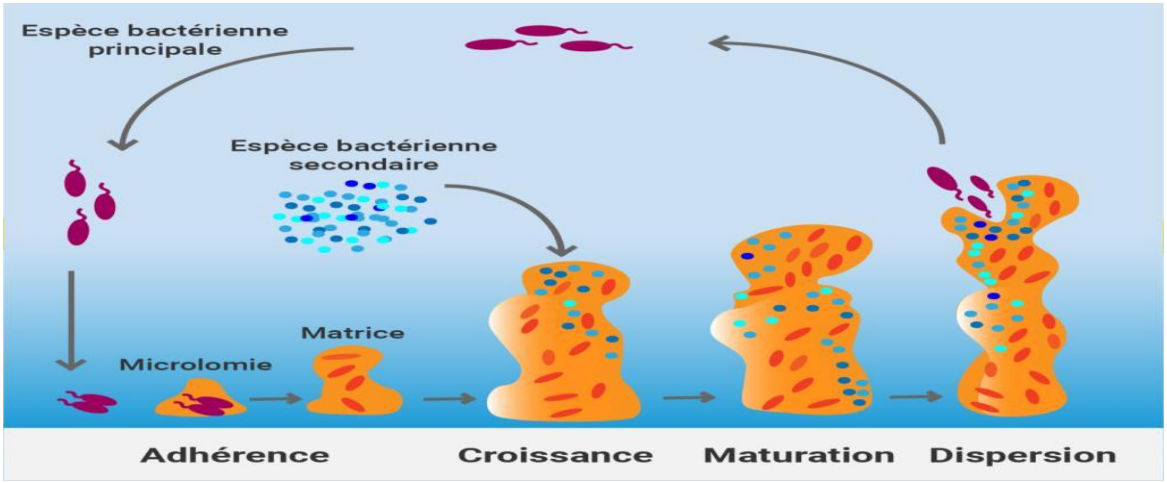


Figure 1: Les étapes de formation de biofilm **(Ren D et al, 2004).**

L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes. Après le conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide grâce à la force du flux, à la gravitation et/ou aux mouvements de leurs flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface.

Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une profonde modification du profil d'expression des gènes **(Schembri, kjaergaard et Klemm, 2003) ;(Beloin et al, 2004) ;(Ren D et al, 2004).**

Les bactéries forment alors des amas à la surface et produisent des polysaccharides extracellulaires. La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent surle biofilm en formation. Enfin le stade de maturation correspond au développement des microcolonies et à la structuration du biofilm : les microcolonies se développent en piliers

d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les microcolonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces.

4. Nature homogène ou hétérogène de biofilm :

Qu'ils croissent sur un substrat vivant ou inerte, les biofilms sont dits homogènes quandils sont composés d'une seule espèce ; hétérogènes quand plusieurs espèces sont associées.

Dans ce dernier cas, le biofilm peut être également caractérisé hétérogénéité structurelle : en son sein coexistent des différentiations géographiquement marquées en termes de populations d'organismes mais aussi de gradients de PH , de teneur en oxygène, avec des structures évoquant parfois des pores, des canaux, des écailles, des couches, dures ou souples selon les cas ; au point de quelquefois presque évoquer une peau ou un super organisme autonome ou symbiote de son hôte. La biodiversité intrinsèque d'un biofilm permet des synergies bactériennes ou fongo-bactériennes qui améliorent sa résistance à certains facteurs de stress, dont les antibiotiques **(Burmolle M, Webb JS et al. (2006)).**

5.Composition de la matrice du biofilm :

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations **(Karatan E, Watnick P. 2009) (Flemming H-C, Wingender J.2010).** La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de β-1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PGA ou PNAG). On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*, *Bordetella spp*. Et *Actinobacillus spp*. La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli, Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas*.

6. Les facteurs de mobilité et d'adhérence :

G.A. O'Toole et R. Kolter ont développé une méthode de criblage génétique qui a permis de caractériser un certain nombre de déterminants importants dans la formation de biofilm **(O'Toole GA, Kolter R. 1998).** Ce criblage est fondé sur la capacité de la population bactérienne de s'attacher à la paroi des puits d'une plaque de microtitration, la présence d'un biofilm étant alors révélée par une coloration au cristal violet **(O'Toole GA, Kolter R. 1998).** Dans le cas de *P. aeruginosa*, le film est localisé à l'interface air-liquide. Ce criblage relativement simple a permis de tester de larges collections de mutants. G.A. O'Toole et R. Kolter ont ainsi mis en évidence deux classes de mutants, l'une étant défectueuse dans la mobilité flagelle, l'autre dans la biogenèse des pili de type IV **(O'Toole GA, Kolter R. 1998).**

Le flagelle est un appendice extracellulaire, polaire chez *P. aeruginosa*, constitué essentiellement par la sous-unité FliC et permettant à la bactérie de se déplacer en milieu liquide ou semi-solide. G.A. O'Toole et R. Kolter ont confirmé, en utilisant la microscopie, qu'un mutant défectueux dans la formation du flagelle n'adhère que très faiblement au support **(O'Toole GA, Kolter R. 1998).**

Récemment, nous avons montré que non seulement la présence du flagelle mais, également, son fonctionnement normal est important pour l'attachement au support **(Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A.2001).** En effet, des mutants dans les gènes motA ou motY, qui codent pour des éléments du moteur du flagelle mais dont l'inactivation n'empêche pas l'assemblage, sont incapables d'adhérer à un support. Ces observations indiquent que le flagelle est particulièrement important pour l'approche du support.

Les pili de type IV sont des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram négatif, dont *P. aeruginosa,* et qui sont impliquées dans un type particulier de mobilité appelée twitching motility **(Wall D, Kaiser D.**

1999). Ils permettent plus particulièrement des mouvements à l'interface de surfaces solides, mouvements fondés sur la capacité de rétraction de ces pili. La biosynthèse des pili de type IV fait intervenir plus d'une vingtaine de gènes, la sous-unité structurale étant codée par le gène pilA.

Contrairement aux mutants dépourvus d'un flagelle fonctionnel, les mutants dont la biogenèse des pili de type IV est affectée peuvent former une monocouche cellulaire sur un support, mais sont en revanche incapables de former les microcolonies caractéristiques **(O'Toole GA, Kolter R. 1998).** Cette observation confirme que la formation des micro-

colonies est bien un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité, et non pas seulement une croissance clonale à partir d'une cellule bactérienne donnée. Chez d'autres organismes, comme *Escherichia coli*, il a été montré que des appendices extracellulaires comme les fimbriae **(Pratt LA, Kolter R.1998)** ou les « curli » **(Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, et al.2001)**, sont également importants lors de la formation du biofilm. En utilisant le type de criblage décrit par O'Toole et Kolter, mais en modifiant légèrement les conditions de croissance, nous avons pu identifier chez *P. aeruginosa* de nouveaux facteurs d'attachement **(Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A.2001).** En effet, des mutations dans les gènes que nous avons appelés cupA (cup pour chaperone usher pathway) empêchent l'attachement au plastique. La voie chaperone usher pathway permet l'assemblage de pili de type fimbriae, qui est essentiels à l'adhérence des *E. coli* uropathogènes **(Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren SJ.2000).** Ce type de système n'avait jusqu'alors pas été décrit chez *P. aeruginosa.*

Le flagelle, les pili de type IV ou encore les Cup sont donc des appendices de surface, essentiels à la formation du biofilm, plus particulièrement dans sa phase initiale. On a vu en particulier comment le flagelle et les pili de type IV permettentl'approche et la colonisation de la surface. Dans l'étape suivante, ces structures ne sont probablement plus nécessaires et laissent la place à d'autres déterminants quivont permettre la structuration et la différenciation en biofilm. Récemment, Peter Greenberg et ses collaborateurs **(Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al.2001)**.Ont réalisé une étude visant à déterminer la variation de l'expression des gènes chez des bactéries organisées en biofilm par rapport à des bactéries planctoniques grâce à l'utilisation de puces à ADN du génome de *P.aeruginosa*.Cette étude montre, entre autres, que l'expression des gènes codant pour PilA, la sous-unité structurale du pilus de type IV, FliC, la sous-unité structurale du flagelle, et CupA1, une sous-unité de type fimbriae, diminue en contexte biofilm. Cela confirme bien que ces structures ne sont pas nécessaires au maintien du biofilm, une fois le développement débuté.

7. Comment étudie-t-on les biofilms bactériens au laboratoire ?

Les approches expérimentales classiques pour étudier les microorganismes ne sont pas adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms. Au cours des dernières années, les chercheurs ont donc développé différents modèles expérimentaux associant analyse moléculaire et microscopie.

*Les bactéries modèles :

La majorité des espèces bactériennes étudiées en laboratoire forment des biofilms. Les bactéries modèles les plus étudiées sont *Pseudomonas aeruginosa,Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Ces bactéries pathogènes ou commensales à Gram négatifs sont facilement manipulables et ont permis l'identification et l'étude de nombreux facteurs moléculaires impliqués dans la formation des biofilms. Plusieurs équipes travaillent également avec la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* qui est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales.

*Les modèles de culture :

*Étude des biofilms en microplaques :

L'utilisation des modèles statiques de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, a permis d'avancer considérablement dans la compréhension dece mode de vie.

La technique des microplaques multi-puits, couplée à l'analyse de mutants de transposition, a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la formation des biofilms sur des surfaces abiotiques **(Genevaux, Muller et Bauda,1996 ; Pratt et Kolter, 1998 ; O'toole et Kolter, 1998).** Un grand nombre de laboratoires utilisent ce modèle pour étudier les étapes précoces de la formation des biofilms.

*Étude des biofilms matures : Afin d'identifier et d'étudier les facteurs moléculaire impliqués dans la maturation et la structuration du biofilm, on utilise des modèles de culture continue comme le micro fermenteurs ou les chambres en flux (flow-cell), inoculés avec des souches bactériennes exprimant des protéines fluorescentes**(Beloin, DA RE et Ghigo 2005).** Le développement de la structure tridimensionnelle du biofilm est ensuite suivi par microscopie confocale laser**(Reisner et al, 2003).**

8. UN modèle d'étude : *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

De nombreuses bactéries, importantes sur le plan médical, ont fait l'objet d'études quant à leur capacité de former des biofilms **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP1999).** On peut citer par exemple des bactéries à Gram positif, comme *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, et des bactéries à Gram négatif comme *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ou *P. aeruginosa*.

Parmi celles-ci, *P. aeruginosa* a fait l'objet d'études assez complètes et informatives sur les mécanismes moléculaires qui interviennent lors du développement d'un biofilm.

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif que l'on trouve dans de nombreux environnements comme le sol, l'eau ou la végétation. C'est également un pathogène

opportuniste capable d'infecter une multitude d'hôtes comme les nématodes, les insectes, l'homme et même les plantes plantes **(Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, et al.).**Chez l'homme, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les affections les plus courantes, on peut citer les pneumonies, les permettant l'attachement, les facteurs sécrétés que sont les toxines et les enzymes **(Filloux A, Michel G, Bally M.),** ou des métabolites comme le cyanide et les phénazines.

L'infection chronique se caractérise par la formation du biofilm bactérien, comme c'est le cas dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose. L'éradication d'un biofilm bactérien pose de graves problèmes sur le plan médical.

En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins probants sur un biofilm **(Brooun A, Liu S, Lewis K 2000)**. Lorsque l'on sait que *P. aeruginosa* est naturellement résistant à un certain nombre d'antibiotiques, de par la faible perméabilité de son enveloppe cellulaire mais également par la présence de nombreuses pompes d'efflux **(Poole K. 2001),** qui rejettent hors de la cellule les drogues qui y pénètrent en faible quantité, on imagine la difficulté à trouver un traitement efficace pour les patients atteints de mucoviscidose. La formation du biofilm est également un infections du tractus urinaire, des brûlures, des plaies ou bien encore les septicémies. De plus, *P. aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose **(Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP 1999).**

La pathogénicité de *P. aeruginosa* est multifactorielle et met en jeu des adhésines facteur de résistance face à la réponse immunitaire de l'hôte (Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP 1999). La raison précise de ces phénomènes n'a pas été clairement établie et plusieurs hypothèses ont été avancées. Les bactéries au sein du biofilm sont dans un environnement pauvre en nutriments et par conséquent ont un métabolisme ralenti et une croissance lente, ce qui rend inefficace une grande majorité d'antibiotiques. Ou encore, la présence de la matrice d'exopolysaccharide ralentit la pénétration d'antibiotiques et de biocides. Ainsi, l'alginate peut capturer le peroxyde d'oxygène, les radicaux libres relargués par les macrophages ou encore certains antibiotiques.

9. Les biofilms et l'homme :

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical. Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimées et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* **(Costerton, Stewart et Greenberg, 1999).**

Caractérisées par des symptômes qui surgissent de façon récurrente, elles contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales : En effet, les biofilms ont la capacitéde se développer sur divers instruments médicaux : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédiques etc... Dans la majorité des cas, la seule solution efficace est le retrait de l'instrument infecté. D'autre part, la contamination des systèmes de climatisation, de ventilation et de distribution d'eau par des biofilms abritant des micro-organismes pathogènes, contribue à la propagation des infections en milieux hospitaliers ou non hospitaliers mais également dans les environnement agroalimentaires où les biofilms sont une source importante de nuisance **(Donlan et Costerton, 2002)**. Protection vis-à-vis du système immunitaire En plus de leur résistance accrue aux antibiotiques, les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés. La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes qui ont très peu d'effet sur le biofilm et qui peuvent endommager les tissus **(Khoury et al, 1992).** La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps **(Costerton ; Stewart et Greenberg, 1999).**

10. Exposition à des concentrations sous - inhibitrice d'antibiotique :

Les données disponibles sur le biofilm exposé à des concentrations sous inhibitrices (sous-CMI) d'antibiotiques sont contradictoires. Dans des études précédentes, il a été observé que la présence de concentrations sous-CMI d'aminoglycosides et de β- lactamines induisaient la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. epidermidis***(Hoffman, L.R., et al, 2005) (Rupp, M.E. and K.E. Hamer,1998).**

Il a également été observé que la présence de cefoxatime à une concentration de 0.5 X laCMI induirait la formation de biofilm ainsi que la production d'exopolysaccharides chez trois isolats de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* **(Majtan, J., et al.,2008).**Chez des isolats de *S. aureus* avec une résistance intermédiaire à la vancomycine, il a été démontré que des doses sous-CMI de vancomycine induisaient la formation de biofilm sur des surfaces en nylon et en silicone alors que de faibles doses d'oxacilline facilitaient la formation de biofilm sur des surfaces en verre **(Mirani, Z.A. and N. Jamil,2010).** Les bactéries pathogènes étant exposées à des concentrations sous-inhibitrices chez lespatients en thérapie, l'augmentation du biofilm pourrait donc représenter un problème majeur pour l'éradication de l'infection **(Odenholt, I., 2002).**

D'un autre côté, il a été démontré que des concentrations de moxifloxacine de 0.03 et 0.06 fois la CMI diminuaient significativement l'adhésion et la formation de biofilm par

Stenotrophomonas maltophilia (Pompilio, A., et al.2010). Chez *S. epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*, une plus faible densité cellulaire a été observée dans les biofilms qui se sont formés en présence de concentrations sous-CMI de dicloxicilline **(Cerca, N., et al, 2005).**

8. Tolérance aux antibiotiques et aux désinfectants :

Un des traits associés aux bactéries en biofilm est leur tolérance accrue aux antibiotiques, aux stress environnementaux ainsi qu'aux désinfectants. Lorsque les bactéries se retrouvent en biofilm, elles deviennent de 10 à 10 000 fois plus résistantes que les cellules planctoniques **(Davies, D., 2003).** Il a é té démontré par (**Luppens et al. (2002)** qu'il fallait augmenter de 600 fois la concentration d'hypochlorite de sodium, qui est considérée comme l'un des agents antibactériens les plus efficaces pour détruire un biofilm formé par *S. aureus*, en comparaison avec une culture planctonique de la même espèce **(Luppens, S.B., et al., 2002).** Plusieurs facteurs ont été suggérés pour expliquer cette augmentation de la résistance chez les bactéries en biofilm. Premièrement, les bactéries en biofilm, et surtout celles retrouvées au centre, possèderaient un métabolisme ainsi qu'un taux de croissance réduits ce qui les rendrait moins sensibles aux antibiotiques. La matrice extracellulaire, en plus de bloquer physiquement le passage des molécules, pourrait absorber ou réagir avec les antimicrobiens et désinfectants, ce qui diminuerait la quantité pouvant affecter les bactéries. Finalement, les bactéries en biofilm seraient physiologiquement différentes descellules planctoniques et exprimeraient des facteurs de protection, comme les pompes à efflux et les régulons impliqués dans la réponse aux stress **(Stewart, P.S., Gilbert, P., et al, 2002).** Le transfert horizontal de gènes entre bactéries participerait également à l'adaptation du biofilm à son environnement. En effet, le transfert de plasmides, de transposons et d'intégrons permettrait aux bactéries d'acquérir des gènes codant pour de nouvelles voies métaboliques, des facteurs de virulence ainsi pour la résistance aux antibiotiques **(Top, E.M., D. Springael, and N. Boon, .2003,Kelly, B.G., A. Vespermann, and D.J. Bolton,2009).** Dans l'environnement, les biofilms retrouvés sont composés de plusieurs espèces bactériennes et les interactions entre celles-ci pourraient permettre l'émergence d'un phénotype spécifique aux biofilms. **Habimana et al. (2010)** ont démontré que le pathogène alimentaire *E. coli O157* :H7 formait un biofilm possédant 400 fois plus de biovolume lorsqu'il était cultivé en présence de la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus* que lorsqu'il était cultivé en monoculture. D'autres études ont également démontré que les biofilms composés de plusieurs espèces étaient généralement plus résistants à la désinfection que les biofilms ne possédant qu'une seule espèce **(Luppens, S.B., et al, 2008, Simoes, M., L.C. Simoes, and M.J. 2009).**

Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques

1. Rappel historique

En 1889, PAUL VUEILLEMIN introduit le terme « antibiose » pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie.

En 1897, ERNEST DUCHESNE envisagea de faire une activité des moisissures à des fins thérapeutiques, mais son idée ne se mettra en place qu'au XXème siècle à la suite de la découverte du docteur ALEXANDER FLEMING : en 1929, il remarqua qu'une de ses cultures de staphylocoques est en partie décimée : les bactéries ont été contaminées par les moisissures penicillium notatum, il constata aussi qu'elle ne se développe plus là où la moisissure prolifère **(Bakalar N. Penicillin, 1940).** Il formule alors l'hypothèse que cette dernière synthétise une substance « la pénicilline » qui bloque le développement de la bactérie. Il essaye alors d'extraire le principe actif des moisissures, mais toutes ces tentatives se soldent par des échecs. Dix ans plus tard, le biochimiste american RENE DUBOS isole le premier antibiotique (ATB) : Gramicidine, celle-ci produite par des bactéries du sol, tue les pneumocoques. Pourtant, ce premier ATB reste extrêmement difficile à purifier et hautement toxique.

Le premier ATB synthétisé a été créé par un biochimiste allemand GERHARD DOMAGK. En 1932, il a découvert qu'un colorant le sulfamidochrysoidine avait un effet sur les streptocoques. Il a alors tout de suite breveté sous le nom prontosil ; d'ailleurs il a reçu le Prix Nobel pour sa découverte en 1939. En découvrant l'hémisynthèse, il a ouvert la voie à l'antibiothérapie moderne **(Ghouli A, Senoussi A, 2015).**



Figure 2 : Docteur Alexander Flemming **(Alexander Fleming (1881-1955).**

2.Définition

Le mot antibiotique (du grec anti : « contre », et bios « la vie ») est utilisé pour définirune substance d'origine naturelle ou synthétique, utilisée contre les infections d'origine bactérienne.

On peut ajouter à cette définition générale que l'antibiotique possède la capacité de tuerles bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique).
Certains antibiotiques peuvent, en fonction de leur concentration, être bactéricides ou bactériostatiques.

D'un point de vue médical, il est nécessaire que l'antibiotique exerce sa toxicité de façon élective envers les bactéries, au moins aux doses employées afin ne pas provoquer de trop nombreux effets indésirables.

Globalement, en moins d'un siècle, les antibiotiques ont augmenté l'espérance de vie de plus de dix ans, soit plus qu'aucun autre médicament **(McDermott W, Rogers DE. Johns Hopkins Med J 1982).**

3. Critères de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

3.1 L'origine : élaborée par un organisme (naturel) obtenus à partir d'autre microorganismes, ou produit par synthèse obtenus par synthèse pur ou en association à des produits de synthèse ou à des produits biologiquement obtenus (semi synthétique), **(Kone Mns, 2009).**

3.2 Le Mode d'action : plusieurs mécanismes d'action, on cite la paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques **(D. Mohammedia, 2012).** (figure3). **(Mevius et al.1999 ; Oxoby, 2002).**

3.2.1 Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Les classes les plus importantes dans ce type d'ATBs sont les Bêtalactamines, les Glycopeptides ainsi que la Fosfomycine. Ils agissent en interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane. Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés àl'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycan.

L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les ATBs inhibant la synthèse de peptidoglycane. Il en résulte l'altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie.

La Fosfomycine : bloque la phase initiale de synthèse du peptidoglycane (Inhibe la pyruvate-N-acétylglucosamine-transférase, enzyme permettant de constituer les précurseurs du peptidoglycane). Les Bêtalactamines et les Glycopeptides (en formant descomplexes avec des précurseurs du peptidoglycane, ils sont également bactéricides, du fait de la lyse bactérienne qu'ils provoquent.) Bloquent la phase finale de polymérisation **(Vanessa Janin, 2010).**

3.2.2 Les Antibiotiques actifs sur la membrane

Colistine : appartient au groupe des Polymyxines qui sont constituées d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Ils ont une charge électropositive qui agit comme des détergents cationiques. Ils se fixent aux phospholipides de la membrane cytoplasmique et sur la membrane externe des bactéries Gram négatif. L'altération de ces deux membranes entraîne des troubles de perméabilité. Il en résulte une rupture de l'équilibre osmotique de la cellule bactérienne et un rélargage dans le milieu extérieur des constituants intracellulaires ; ce qui entraîne la mort de la bactérie.

3.2.3 Les Antibiotiques actifs sur l'ADN

3.2.3.1 Inhibiteurs de la réplication

Les quinolones : sont largement utilisés en clinique, Nitrofurane : ciblent l'ADN, leurs activités nécessitent une réduction de leurs groupements NO2 réalisée par les nitroréductase des bactéries aérobies. Les dérives réduites provoquent des coupures et desmutations dans l'ADN.

3.2.3.2 Inhibiteurs de la transcription

La rifampicine : Bloque la transcription par la liaison à la sous-unité β de l'ARN-polymérase bactérienne, elle est également bactéricide **(Jean-luc Aboya Moroh, 2013).**

3.2.4 Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien 70S par transcription de l'ARNm. Les ATBs de cette catégorie les plus utilisés en médecine sont les **Aminosides**, **Macrolides**, **Tétracyclines**, **Chloramphénicol** (Se lie à la sous-unité 50S

empêchant l'attachement des ARN de transfert au site A du ribosome.

C'est un antibiotique bactériostatique).Acide Fucidique (L'Acide Fucidique agit sur la synthèse protéique en inhibant le facteur d'élongation G (translocase), ce qui bloque la traduction de l'ARNm au niveau de la sous-unité 50S du ribosome) **(Belhadj Asmaa, Belboula Hind; 2015).**

3.2.5 Antibiotiques agissant par inhibition compétitive

Sulfamides : Ce sont des inhibiteurs enzymatiques de la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique, précurseur des bases puriques et pyrimidiques constitutives de l'ADN bactérien. Les sulfamides se comportent comme des analogues structuraux de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) : molécule représentant le point de départ de la synthèse des folates. Ils bloquent ainsi par inhibition compétitive la dihydropteroate-synthétase (DHPS)qui analyse la première réaction de cette chaîne métabolique. Les diaminopyrimidines (Triméthoprime) agissent par inhibition de la dihydrofolate-réductase (DHFR) qui permet la réduction de l'acide hydrofolique en acide tétrahydrofolique **(Vanessa Janin, 2010).**

Triméthoprime : C'est un analogue stérique du noyau ptéridine de l'acide dihydrofolique, il inhibe l'action de la dihydrofolate réductase (D.MOHAMMEDI, 2012),**(Ramseyer Jérémie, 2010).**

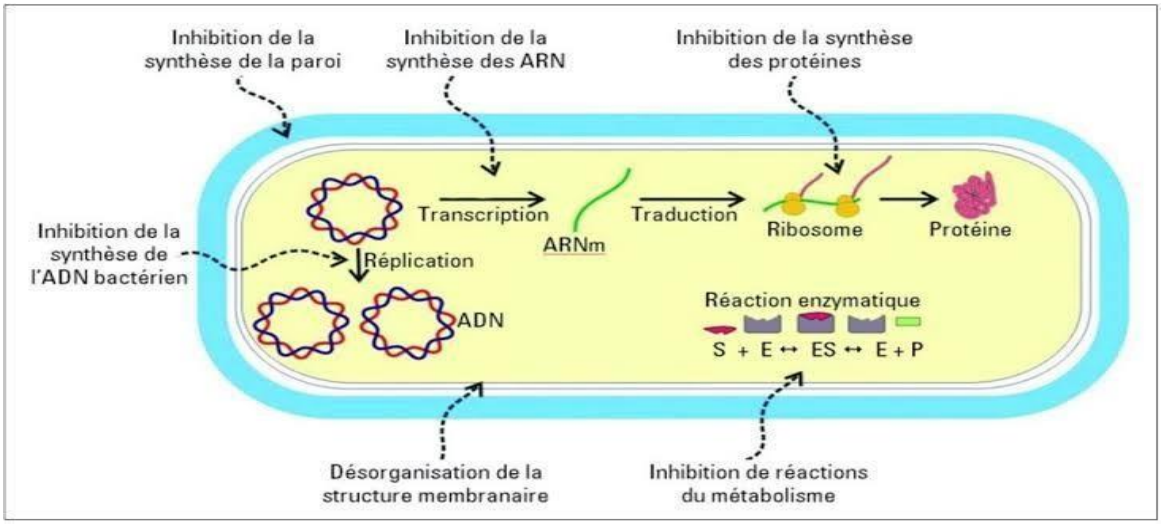


Figure 3 : Mécanisme d'action des antibiotiques sur la bactérie **(Mevius et al.1999 ; Oxoby, 2002).**

3.3 Le spectre d'activité : spectre étroit ou large **(Morghad Touhami, 2013).**

3.4 Structure chimique :

4.4 La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles(beta-lactamines, aminosides, tétracyclines…etc.), (Van Bambeke F, Pharm S, 2007- 2008) nous adopterons cette classification, qui est la plus utilisée (Très variable), sur laquelle il y a ensuite hémi synthèse **(voir Annexe 1).**

4. Principales classes et familles d'antibiotiques :

On distingue cinq classes principales d'antibiotiques **(Eureka Santé par VIDAL,2018)**

En dehors de ces cinq classes (Antibio-responsable, avril 2018), on retrouve aussi, les glycopeptides ou lipoglycopeptides (vancomycine, teicoplanine, dalbavancine), la fosfomycine, un lipopeptide (daptomycine), les polymyxines, les phénicols, l'acidefusidique, les oxazolidinones, les quinoléines, la mupirocine, les sulfamides et triméthoprine, les produits nitrés et les antituberculeux.

4.1 Les bêta-lactamines :

Elles sont bactéricides, elles bloquent la synthèse de la paroi bactérienne, Le groupe principal et le plus ancien est celui des pénicillines

Certains inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) possèdent également un noyau bêta-lactame. Ces inhibiteurs sont toujours utilisés en association. L'avibactam est également un inhibiteur des bêta-lactamases mais ne possèdepas de noyau bêta lactame comme les précédents **(Ambler, R.P. (1980).**

***Structure et classification :**

La base commune à toutes les β-lactamines est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules **(Bryskier, 1999).** À partir de cette structure, cinq groupes ont été développés par adjonction d'un cycle latéral: les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β-lactamases **(Cavallo et al. 2004).**

4.1.1 Pénames (Pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β-lactame. Selon la nature de la chaine latérale, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) **(Ruppé, 2010).**

4.1.2 Céphèmes (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle β-lactame à un cycle dihydrothiazine pour former le noyau céphème. La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables **(Cavallo et al. 2004).** On distingue ainsi: Les céphalosporines de première génération (C1G) : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. Exemples : céfalotine, céfazoline et céfalexine.

Les céphalosporines de deuxième génération (C2G) : elles ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Exemples : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan.

Les céphalosporines de troisième génération (C3G) : elles ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries. Exemples : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone.

Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et cefpirome **(Ruppé, 2010).**

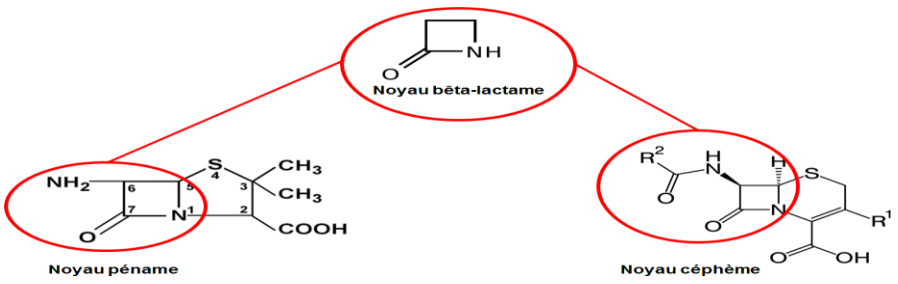


Figure 4 : Beta-lactamines (pénicillines-céphalosporines) (Cavallo et al., 2004 ; Ruppé, 2010)

4.1.3 Pénèmes

Les pénèmes se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle β-lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes : les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes **(Bryskier, 1999).** Les carbapénèmes possèdent un très large spectre antibactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des β-lactamases. Elles sont considérées comme traitement de choixdes infections sévères à bactéries à Gram négatif **(Kattan et al. 2008).** Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème **(Nordmann et Carrer, 2010).**

4.1.4 Monobactames

Se caractérisent par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β-lactame. L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé **(Ruppé, 2010).** Il montre une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries, pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β-lactamases **(Cavallo et al. 2004).**

* **Inhibiteurs de β-lactamases**

Il s'agit de l'acide clavulanique **(clavame ou oxapéname),** sulbactam et tazobactam (pénicillines sulfones). Ce sont des β-lactamines à faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une β-lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par les β-lactamases **(Cavallo et al. 2004).** En effet, l'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin et la ticarcilline dans le Claventin, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline. Le spectre d'inhibition de ces molécules est limité aux pénicillinases **(Ruppé, 2010).**

***Mécanisme d'action**

Les β-lactamines interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane, polymère majeur de la paroi bactérienne, par inactivation des enzymes appelées protéines liant les pénicillines ou PLPs **(Cavallo et al. 2004).** Il s'agit d'enzymes d'activité variablede type transpeptidase, transglycosylase ou carboxypeptidase, localisées sur la face internede la membrane cytoplasmique **(Philippon, 2008).**

Les β-lactamines présentent une analogie structurale entre le noyau β-lactame et le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine, du pentapeptide constitutif du peptidoglycane, qui constitue le substrat naturel des PLPs. La fixation du cycle β-lactame sur le site actif des PLPs aboutit à la formation d'un complexe acylenzyme covalent provoquant l'inactivation de ces enzymes **(Livermore, 1995).** Cette liaison ainsi formée a deux conséquences : elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique) **(Tankovic, 2000)** et elle entraîne une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide) **(Bonnet, 2006).**

4.2 Aminosides

Les aminosides forment une classe d'antibiotiques qui conserve une place incontournable au sein de l'arsenal antibactérien hospitalier. Leur large spectre d'activité et leur effet bactéricide rapide constituent des atouts majeurs **(Nguyen et Lambert, 2012).**

Ces antibiotiques sont utilisés en thérapeutique depuis la découverte de la streptomycine par Waksman et ses collaborateurs en 1944 **(Bryskier, 1999).** Ils sont le plus souvent utilisés en association avec les β-lactamines ou les fluoroquinolones pour leur effet synergique **(Doi et Arakawa, 2007).**

***Structure et classification**

Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules hydrophiles, basiques et polycationiques. Leur structure de base comporte un cycle central aminocyclitol saturé, relié par des liaisons glycosidiques à deux ou trois hexoses **(Vakulenko et Mobashery, 2003).** Ce cycle central peut être la streptidine, l'actinamine ou la fortamine mais le plus souvent il s'agit de la 2-désoxystreptamine (DOS) .Les 2-DOS regroupent la plupart des composés utilisés en thérapeutique humaine comme : la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine **(Nguyen et Lambert, 2012).** Les composés contenant le cycle DOS sont classés en sous-familles en fonction de la substitution de ce cycle. On distingue ainsi : Les 2-désoxystreptamines monosubstituées en position 4 : Néamine

Les 2-désoxystreptamines monosubstituées en position 5 : Hygromycine B

Les 2-désoxystreptamines bisubstituées en position 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS) : Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine.

Les 2-désoxystreptamines bisubstituées en position 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS) : Kanamycines A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibékacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine **(Jana et Deb, 2006).**

***Mécanisme d'action**

Les aminosides ont pour principale cible le ribosome. Ils doivent tout d'abord pénétrer dans le cytoplasme bactérien **(Magnet et Blanchard, 2005).** Chez les bactéries à Gram négatif, Les aminosides diffusent à travers la membrane externe par un système de porines. Une fois dans l'espace périplasmique, le franchissement de la membrane cytoplasmique nécessite un transport actif, oxygène dépendant. Cette étape limitante, explique la résistance naturelle aux aminosides des germes anaérobies stricts **(Bryan et Kwan, 1983).** Les quelques molécules ayant atteint le cytoplasme se fixent au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (Le site A), dans la sous-unité 30S du ribosome **(Durante-Mangoni et al. 2009).** Cette liaison inhibe L'appariement de l'ARNm au ribosome et empêche l'initiation de la traduction et peut aussi causer une mauvaise interprétation du code génétique, conduisant à la synthèse de protéines "nonsens" **(Kotra et al. 2000).** Les protéines aberrantes nouvellement synthétisées sont incorporées à la membrane cytoplasmique. Elles endommagent son intégrité et facilitent ainsi l'entrée dans le cytoplasme de nouvelles molécules aminosides, qui vont accroître les dommages cellulaires et entraîner la mort de la cellule **(Taber et al. 1987).** Les aminosides peuvent en outre, s'accumuler de façon irréversible dans la cellule bactérienne, altérer la synthèse de l'ADN ou dégrader l'ARN ou encore provoquer des désordres ioniques importants dans la cellule bactérienne **(Lambert, 1997).** Cette pléiotropie suggère que l'action des aminosides pourrait ne pas être limitée à la synthèse protéique, ce qui explique leur effet bactéricide rapide **(Forge et Schacht, 2000).**

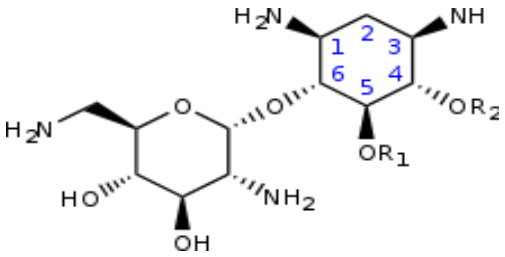


Figure 5 : Structure de base des aminosides **(Vakulenko et Mobashery, 2003)**

4.3 Quinolones

Depuis la découverte de l'acide nalidixique, en 1962 **(Lesher et al. 1962),** les quinolones, antibiotiques synthétiques, ont évolué et sont devenues des agents importants et efficaces dans le traitement des infections bactériennes **(Zhanel et al. 2004).** Ce sont des antibiotiques bactéricides très largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Ilssont caractérisés par

un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale et une bonne diffusion dans les tissus **(Hooper et Rubinstein, 2003).**

***Structure et classification**

La structure chimique des quinolones est un acide pyridine-β-carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 **(Soussy, 2006).** Dans les années 80, sont apparues les fluoroquinolones ou quinolones de 2ème génération par l'addition d'une molécule de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position, qui a augmenté l'activité de ces composés ainsi que leur absorption orale et leurdistribution dans les tissus **(Ball, 2000).**

Les quinolones sont classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et deleur date de mise sur le marché **(Cattoir, 2012).** On distingue :

Les quinolones de première génération : comprennent des molécules à spectre étroit, utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries **(Andriole,2005).** Exemples : acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique.

Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones: présentent un spectre élargià d'autres bacilles à Gram négatif (Pseudomonas aeruginosa), à certains coccis à Gram positif (Staphylococcus aureus) et aux bactéries intracellulaires. Exemples : norfloxacine, ofloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine.

Les quinolones de troisième génération ou fluoroquinolones anti-pneumococciques : ontété développées pour étendre le spectre à Streptococcus pneumoniae. Exemples : sparfloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine.

Les quinolones de quatrième génération : présentent un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies strictes. Exemples : trovafloxacine, gatifloxacine **(Cattoir, 2012).**

***Mécanisme d'action**

Les quinolones inhibent les topoisomérase de type II (gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication **(Hooper, 2001).** L'ADN gyrase introduit un super-enroulement négatif dans la double hélice d'ADN bactérien. Cette activité est essentielle pour l'initiation de la réplication de l'ADN ainsi que pour sa transcription **(Levine et al. 1998).** La topoisomérase IV a une activité de décaténation, qui permet la séparation des chromosomes répliqués à la fin d'uneséquence de réplication **(Zechiedrich et al. 1997).**

Les quinolones interagissent avec le complexe enzyme-ADN (la gyrase ou la topoisomérase IV) et provoquent des changements conformationnels entraînant une désactivation de l'enzyme **(Drlica et Zhao, 1997).** Le complexe quinolone-enzyme-ADN ainsi formé, bloque la progression de la fourche de réplication ce qui inhibe la synthèse de l'ADN et conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne **(Soussy, 2006).** De plus, les coupures d'ADN double brin stabilisées par les quinolones constitueraient des lésions nonréparables de l'ADN, capables de déclencher l'inactivation de certaines synthèses protéiques responsable de l'effet bactéricide de ces antibiotiques **(Drlica et al. 2008).**

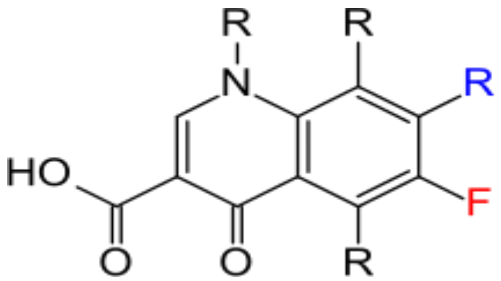


Figure 6 : Structure de base des quinolones **(Andriole, 2005).**

4.4 Les macrolides

Ces antibiotiques sont actifs sur certaines "bactéries gram positif". Ils sont administrés dans les infections du nez, de la gorge, des oreilles (lorsque les pénicillines ne peuvent pasêtre utilisées), ainsi que des infections des bronches et des poumons, de la peau, des organes génitaux et de la bouche. L'utilisation de certains macrolides est possible pendantla grossesse. Leurs effets indésirables sont surtout digestifs.

***Structure et classification**

Ce sont des hétérosides lipophiles de poids moléculaire élevé qui sont constitués d'unegénine qui est un macrocycle lactonique oxygéné comportant divers substituants (fonction alcool, cétone, méthyle, éthyle) et d'une partie osidique consistuée au minimum de 2 oses déshydroxylés (des déoxyoses) : au moins un ose aminé (D-désosamine) et au moins un ose neutre (de type cladinose) ou bien un disaccharide. Au moins un des oses et toujours diméthylaminé, ce qui confère à ces molécules un caractère basique faible **(pharmacorama, érythromycine, 2019).** Classiquement on distingue trois groupes suivant le nombre de chainons de la géninelactonique :

Macrolides dont la génine possède 14 chainons : substituée en 4 par un cladinose (dérivéde L-mycarose) et en 6 par D-désosamine : c'est le cas de l'érythromycine, la roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, télithromycine.

Macrolides dont la génine possède 16 chainons : substituée en 6 par un disaccharide et une double liaison en 11 et 13 : c'est le cas de la josamycine, midécamycine, spiramycine.

Macrolides dont la génine possède 15 chainons et correspond au groupe des azalides avecun représentant ; azithromycine qui est un macrolide hémi-synthétique dérivé de l'érythromycine.

***Mécanisme d'action**

Les macrolides agissent au niveau de la synthèse protéique de la bactérie, en empêchant la synthèse protéique, par fixation sur la sous unité50S des ribosomes bactériens.

La réplication, la duplication et donc la division cellulaire bactérienne sont ainsi stoppées (c'est la bactériostase).

La bactériostase est le ralentissement de la croissance bactérienne, pouvant aller jusqu'àl'arrêt de cette croissance ; lorsque cette bactériostase est maximale, le nombre des bactéries reste constant. Les défenses naturelles de l'organisme(ou un autre antibiotique encas d'association) pouvant alors intervenir plus facilement pour éliminer le foyer infectieux.

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il arrive en quantité suffisante sur le lieu de l'infection afin d'atteindre la CMI (qui est la concentration minimale inhibitrice capable d'inhiber toute culture de bactéries) et que le germe soit sensible à cet antibiotique. La diffusion de l'antibiotique dans l'organisme est un paramètre important à connaitre lors de la prescription.

La diffusion : les macrolides se distribuent de façon large dans l'organisme, sauf dans leLCR (liquide céphalorachidien), le cerveau et les urines.

Les macrolides sont des médicaments de choix dans toutes les infections à germes intracellulaires.

La résorption, l'élimination et la demi-vie de l'antibiotique sont également des paramètres importants car ils déterminent le mode d'administration du produit et le nombre de prises quotidiennes, afin de maintenir l'efficacité du traitement.

La résorption : la résorption digestive des macrolides est correcte.

L'élimination : l'élimination des macrolides est essentiellement biliaire, après métabolisation par le cytochrome P450 au niveau du foie, d'où l'existence d'interférences médicamenteuses avec les macrolides.

Ces différents paramètres pharmacocinétiques font que les macrolides s'administrent à raison de 2 prises par jour par voie orale.

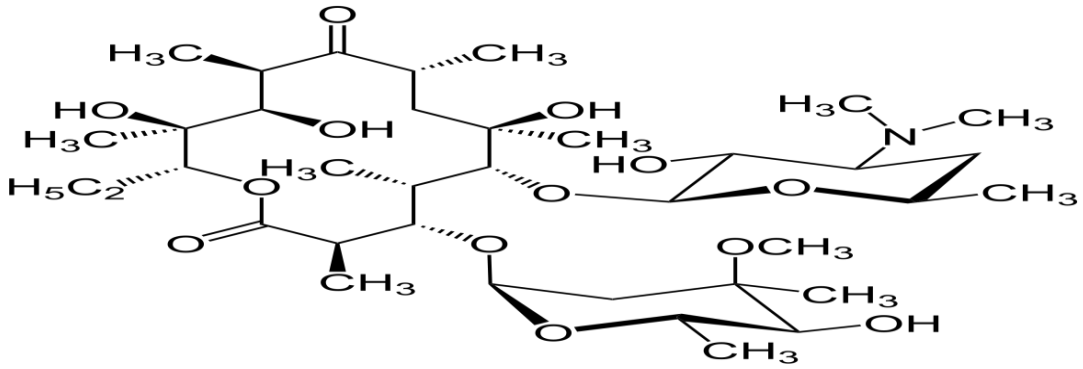


Figure 7 : Erythromycine, chef de file des macrolides **(pharmacorama, érythromycine, 2019).**

4.5 Les cyclines

Les cyclines sont des antibiotiques qui empêchent la synthèse des protéines des bactéries. Ces antibiotiques sont indiqués dans diverses maladies infectieuses, notamment respiratoires et génitales, et dans le traitement de l'acné (souvent pendant plusieurs mois). Les cyclines ne doivent pas être utilisées à partir du quatrième mois de la grossesse et chez l'enfant de moins de huit ans, en raison d'un risque de coloration des dents.

***Mécanisme d'action**

Les tétracyclines agissent au niveau de la synthèse protéique de la bactérie, grâce à sa capacité de diffusion intracellulaire, en empêchant la synthèse protéique.

La réplication, la division cellulaire bactérienne et donc la multiplication des bactéries sont ainsi stoppées (c'est la bactériostase). La bactériostase est donc le ralentissement de la croissance bactérienne, pouvant aller jusqu'à l'arrêt de cette croissance lorsque cette bactériostase est maximale, le nombre des bactéries reste constant. Les défenses naturelles de l'organisme (ou un autre antibiotique en cas d'association) pouvant alors intervenir plus facilement pour éliminer ce foyer infectieux.

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il arrive en quantité suffisante sur le lieu de

l'infection afin d'atteindre la CMI (qui est la concentration minimale inhibitrice capable d'inhiber toute culture de bactéries) et que le germe soit sensible à cet antibiotique. La diffusion de l'antibiotique dans l'organisme est un paramètre important à connaitre lors de la prescription.

La résorption, l'élimination et la demi-vie de l'antibiotique sont également des paramètres importants car ils déterminent le mode d'administration du produit et le nombre de prises quotidiennes, afin de maintenir l'efficacité du traitement.

Diffusion : Elles ont une bonne diffusion intra et extra cellulaire dans l'organisme (sauf dans le Système nerveux central, le liquide céphalorachidien et les articulations).

Métabolisation et élimination : Elles sont peu ou pas métabolisées et éliminées en majeure partie sous forme active par la bile, les fèces et les urines.

La demi-vie est de l'ordre de 20 heures.

Ces différents paramètres pharmacocinétiques, autorisent l'administration de 1 à 2 prises par jour.

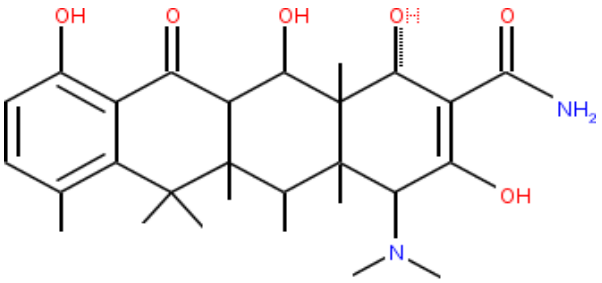


Figure 8 : Structure de base des cyclines **(sciencedirect.com, cycline antibiotiques, 2019).**

5. Critères d'efficacité et d'activité d'un antibiotique

Pour que l'antibiotique choisi puisse être actif sur la ou les bactéries à l'origine de l'infection, il faut **(EurekaSanté par VIDAL, 2018)** :

- qu'il possède un mode d'action qui lui permette d'agir sur cette bactérie
- qu'il parvienne là où est la bactérie et à des concentrations suffisamment élevées

qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de la détruire, c'est ce que l'on appelle la bactéricidie soit d'en arrêter la multiplication, c'est la bactériostase.

Il faut aussi que dans les conditions d'administration qui permettent d'obtenir l'effet antibactérien, l'antibiotique n'induise pas ou peu d'effets indésirables inacceptables voire toxiques à d'autres niveaux et dégrade les autres organes sains.

L'objectif usuel de l'antibiothérapie est de diminuer suffisamment le nombre de bactéries présentes pour que le système immunitaire puisse éliminer les bactéries restantes. Cependant, si le système immunitaire est altéré (exemples : maladies auto-immune, infection par le virus du SIDA, immunodépression suite à une chimiothérapie…) ou si l'infection fait courir un risque vital, il devient nécessaire que l'antibiotique détruise toutesles bactéries.

6. Les paramètres d'activité d'un ATB

6.1 Spectre d'activité

Le spectre d'activité représente l'ensemble des espèces bactériennes sur les quelles cet ATB est actif ce qui permet de distinguer différentes famille d'ATBs ; lorsqu'un ATB est actif sur un grand nombre d'espèces on parle d'ATB à large spectre, exemple : Céphens, et dans le cas contraire c'est-à-dire qu'il est actif sur un nombre limité d'espèces, on parle d'un ATB à spectre étroit, exemple : Pénicilline M.

6.2 Bactériostatique et bactéricide

L'action des ATBs sur les germes peut prendre deux aspects : bactériostase et bactéricidie. En réalité ces deux aspects sont complémentaires et ne sont que des degrésdifférents d'une seule et unique espèce bactérienne **(Nauciel C, Vildé J-L, 2005).**

6.2.1 Bactériostase

C'est l'arrêt du développement des micro-organismes par inhibition partielle ou totale de leur croissance. Cette activité est estimée in vitro par la mesure de la concentration minimale inhibitrice(CMI). L'inhibition cesse dès que l'ATB disparait, et la croissancepeut alors reprendre **(Bouchakour Souad, Hammouchi Meryem; 2016).**

*** La concentration minimale inhibitrice (CMI)**

C'est la concentration minimale d'ATB permettent d'inhiber la multiplicationbactérienne après 18 à 24h de contact à 37°C.

La détermination de CMI s'effectue par la méthode de dilution.

-Sur milieu liquide



Figure 9 : Détermination de la CMI sur milieu liquide **(Anonyme 1, 2012).**

-Sur milieu solide

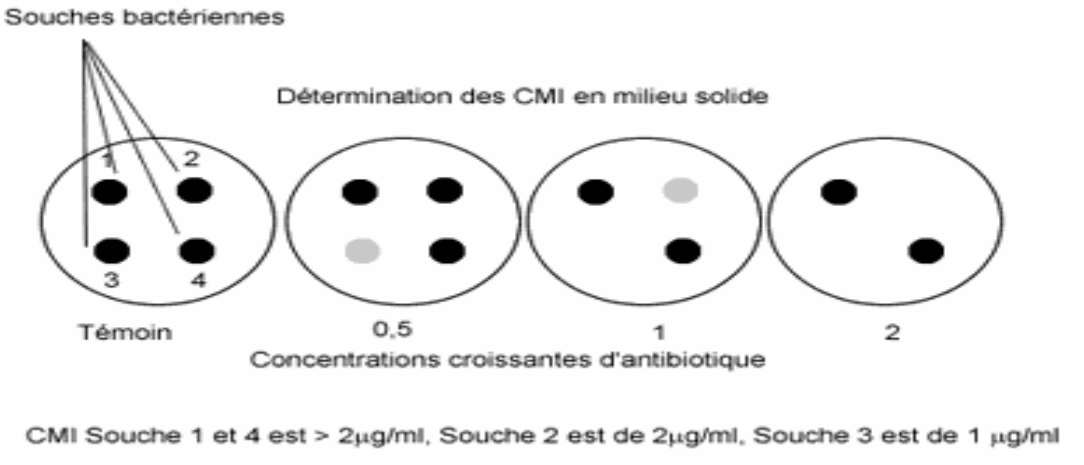


Figure 10 : **Détermination de la CMI sur milieu solide** (Anonyme 1, 2012).

***Antibiogramme**

La détermination de la CMI n'est utilisée en pratique que pour des cas particulier. En routine, on utilise une méthode plus approximative : un antibiogramme. L'antibiogramme technique de laboratoire vise à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs ATBs, repose sur la compétition entre la croissance d'une souche bactérienne et la diffusion d'un ATB à partir d'un disque de papier pré imprégné de l'ATB, dans un milieu gélosé.

La mesure du diamètre permet de classer les bactéries en S ,R ,I vis-à-vis l'ATB, en comparant les résultats obtenus en CMI avec des concentrations critiques définies par la société savante de microbiologie **(Elsevier Masson;2011).**

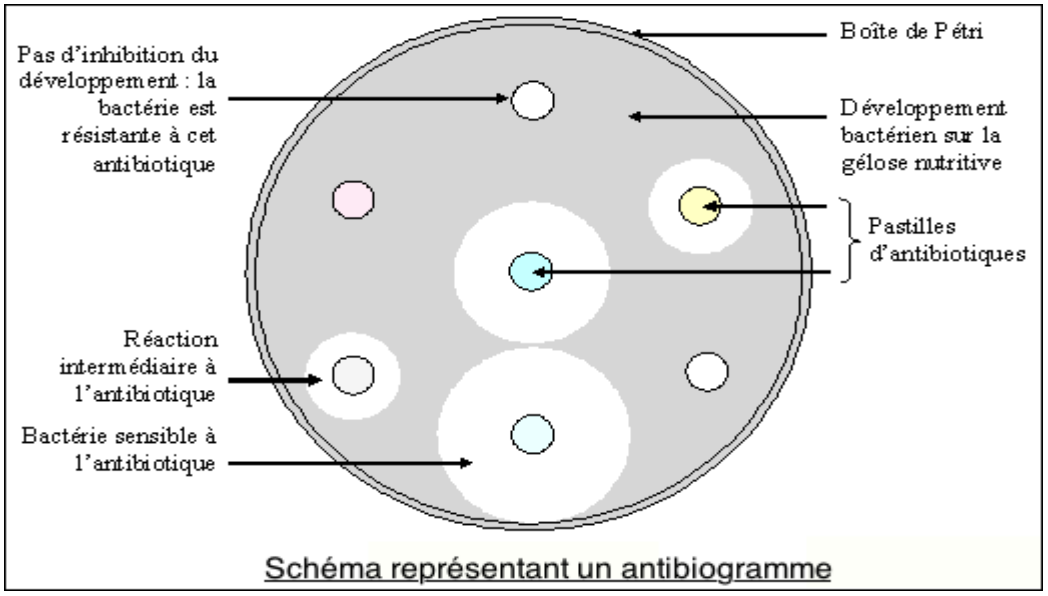


Figure 11 : Antibiogramme **(Haute garonne.gouv, Visite sanitaire, 2019)**

6.2.2 Bactéricidie

La bactéricidie est l'arrêt du développement des micro-organismes par mort cellulaire avec/ou sans lyse. Cette activité est estimée in vitro par la mesure de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB). Pour mettre en évidence un effet bactéricide,il faut dénombrer les bactéries avant et après le contact avec l'ATB **(Bouchakour Souad, Hammouchi Meryem; 2016).**

***Concentration minimale bactéricide (CMB)**

On appelle concentration minimale bactéricide (CMB) la concentration d'ATB qui laisse moins de 0.01 % de survivants après 18h à 24h de culture à 37°C .Les ATBs classés comme bactéricides sont ceux pour lesquels il y a peu d'écart entre la CMI et la CMB **(Nauciel C, Vildé J-L, 2005).**

***Effet bactéricide concentration –dépendant, temps-dépendant**

Effet Bactéricide de certains ATBs est concentration-dépendant (ex: Aminosides et Fluoroquinolones),ce qui implique que l'activité bactéricide croit avec la concentration de l'ATB; pour d'autres, il est temps-dépendant (ex: Bêtalactamines et Glycopeptides) implique que l'effet bactéricide dépend de la durée pendant laquelle les concentrations demeurent supérieurs à la CMB **(Chast F, Rev Fr Lab;2004).**

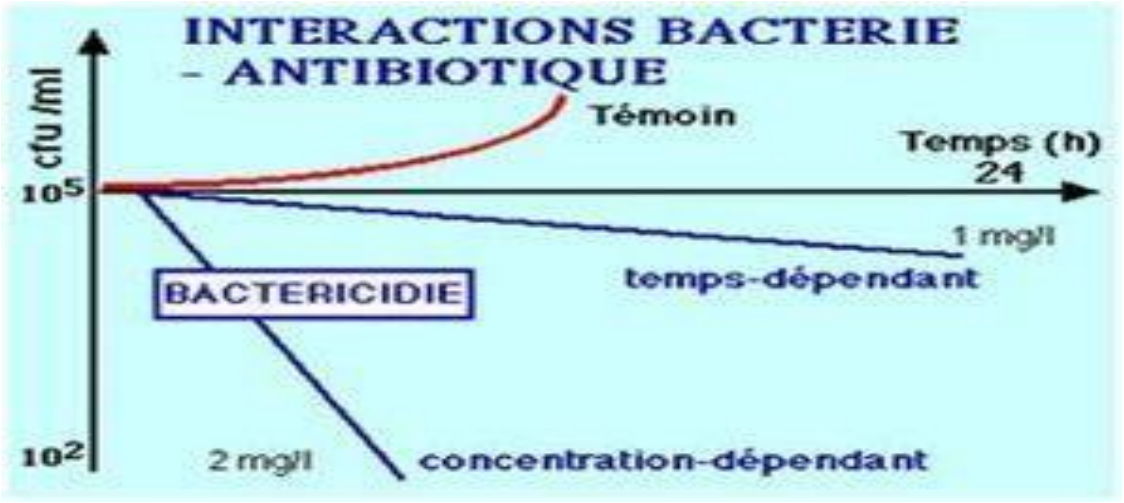


Figure 12 : Effet bactéricide concentration-dépendant, temps-dépendant **(Chast F, Rev Fr Lab;2004).**

6. Pharmacocinétique des ATBs

Pour éradiquer une infection, l'ATB doit parvenir à son site d'action, c'est à dire atteindre les germes situés dans une structure donnée d'un organe, dans une cellule ou dansdes liquides extra/péri-cellulaires, à des concentrations adéquates et cela pendant le temps nécessaire. Ce passage du lieu d'administration jusqu'au site(s) d'action se fait en quatre phases différentes :

6.1 Absorption

L'absorption d'une molécule, c'est à dire son passage du site d'administration à la circulation sanguine est en fonction à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration notamment de la voie (orale, parentérale) et de la formulation du médicament.

Certaines classes d'ATBs ont une bonne absorption digestive (Macrolides, Tétracyclines, Sulfamides); pour d'autres classes, l'absorption est nulle (Aminosides, Polypeptides), la voie parentérale peut être nécessaire dans le cas d'un produit irritant (exemple : Vancomycine) ou pour obtenir un effet systémique. Enfin, dans certaines classes d'ATBs (Bêtalactamines) certaines molécules sont bien absorbées, ce qui permet l'administration orale alors que d'autres devront être injectées; pour les ATBs administrés par voie orale, il peut exister des L'absorption peut aussi être modifiée (en plus ou en moins) lorsqu'il existe chez un malade une pathologie du tube digestif **(Dr Najoua Bouzgarou-Besbes, Dr Mohamed Hechmi BESBES).**

6.2 Distribution

L'ATB parvient au site de l'infection plus ou moins bien : certains organes sont mieux irrigués que d'autres ; le site même de l'infection peut être mal irrigué. Les germes peuvent être situés dans le sang, dans les espaces extracellulaires, ou à l'intérieur de cellules qui lesont phagocyté. Lorsque le passage de l'ATB du sang vers un site d'infection se fait par diffusion passive, Il se fera d'autant mieux que le gradient des concentrations entre le plasma et les tissus sera important. Si les bactéries se développent à l'intérieur de cellules, il faudra que les ATBs puissent y parvenir, sous une forme active ; un pH intra cellulaire plus ou moins acide ou basique modifie la vitesse de traversée des membranes par des molécules, plus ou moins ionisées ; les Quinolones, la Rifampicine, l'Isoniazide, l'association Sulfaméthoxazole Triméthoprime pénètrent particulièrement bien **(Dr Najoua Bouzgarou-Besbes, Dr Mohamed Hechmi BESBES), (Vivien E. Biosynthèse de l'albicidine, 2005).**

6.3 Transformation

Comme tous les médicaments, les ATBs peuvent subir des transformations, en métabolites, actifs ou non sur les bactéries, toxiques ou non (c'est à dire induisant des effets indésirables). Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes (foie, rein, poumon). Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs (Chloramphénicol, Erythromycine et Rifampicine), tandis que d'autres sont peu métabolisées (Pénicilline, certaines Céphalosporines, Aminosides, Tétracyclines et Polymyxines), (Dr Najoua Bouzgarou-Besbes, Dr Mohamed Hechmi BESBES), (Vivien E. Biosynthèse de l'albicidine, 2005).

6.4 Elimination

L'élimination des ATBs se fait par deux voies principales urinaire (Pénicillines, Aminosides, Sulfamides,…) et biliaire (Thiamphénicol), **(Dr Najoua Bouzgarou-Besbes, Dr Mohamed Hechmi BESBES), (Vivien E. Biosynthèse de l'albicidine, 2005).**

Chapitre III : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

1. Résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition desATBs. L'utilisation massive et répétée d'ATBs en santé humaine et animale génère au fil du temps une augmentation des résistances bactériennes et peut conduire à l'émergence de bactéries résistantes qui vont rendre les traitements ATBs ultérieurs moins efficaces d'abord pour le patient chez qui elles apparaissent, mais également pour la collectivité quand elles se diffusent dans l'environnement et se transmettent à d'autres patients.**(Chaussade H, Sunder S, Bernard L, Coloby P, Guy L, Karsenty G, et al. nov.2013)**

1.1 Définition de la résistance :

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique lorsque le taux nécessaire à inhiber sa croissance in vitro est supérieur aux taux qui peuvent être couramment atteints in vivo. On parle alors de résistance bactérienne quand un micro-organisme s'adapte au milieu et réussit à modifier son métabolisme pour continuer à se développer en présence de l'ATB qui devrait le détruire **(Guillot JF, et al.1989).**

La résistance des bactéries aux ATBs est rencontrée en milieu communautaire (c'est à dire en dehors du milieu hospitalier) ou en milieu hospitalier.

1.2 Types de résistances

La résistance aux ATBs peut être naturelle ou acquise :

1.2.1 Résistance naturelle

Résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien à un ATB. Ce caractère de résistance est présent dans son chromosome bactérien, il est constant et stable, transmis uniquement de manière héréditaire **(Tristan Coustés, et al.2016).**

1.2.2 Résistance acquise

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques souches d'une espèce bactérienne. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du patrimoine génétique de la bactérie soit par mutation chromosomique ou bien extra-chromosomique lui permettant de tolérer une concentration d'ATB plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce **(Lozniewski A., Rabaud C., Nancy, et al.2010).**

2. Mécanismes de résistance

Deux grands mécanismes de résistance :

2.1 Mécanismes génétique

2.1.1 La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation phénomène rare, indépendant, due au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'ATB, mais ce dernier révèle la mutation de la résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes, Toutes les mutations ont pour conséquencela perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'ATB. **(Calgagno F., Lacroix R, et al.2011), (Roy PH, et al.1997).**

2.1.2 La résistance extra chromosomique (plasmides)

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

Elle résulte d'acquisition d'un plasmide qui est transféré par les pilis sexuels par contact direct entre des bactéries. Le donneur et le receveur ont à la fin du processus une copie du plasmide, **(Calgagno F., Lacroix R, et al.2011), (Roy PH, et al.1997).**

2.1.3 Le phénomène de tolérance aux antibiotiques

Il correspond à une augmentation très marquée de la CMB de l'antibiotique vis-à-vis du germe, alors que son effet bactériostatique semble peu ou pas touché. Les souches tolérantes cessent de se développer en présence d'un antibiotique : elles ne prennent pas d'expansion mais elles ne sont pas tuées.

Normalement, l'effet du médicament sur les bactéries tolérantes est suffisant pour stopper leur développement et permettre au système immunitaire de l'organisme de les éliminer. Cependant, lorsque la durée du traitement est trop courte, les cellules tolérantessont capables de proliférer à nouveau. La tolérance est souvent un précurseur de la résistance, **(Calgagno F., Lacroix R. (2011), (Parlement du Canada, (2008).**

2.2 Mécanismes biochimique

On distingue trois principaux mécanismes de résistances

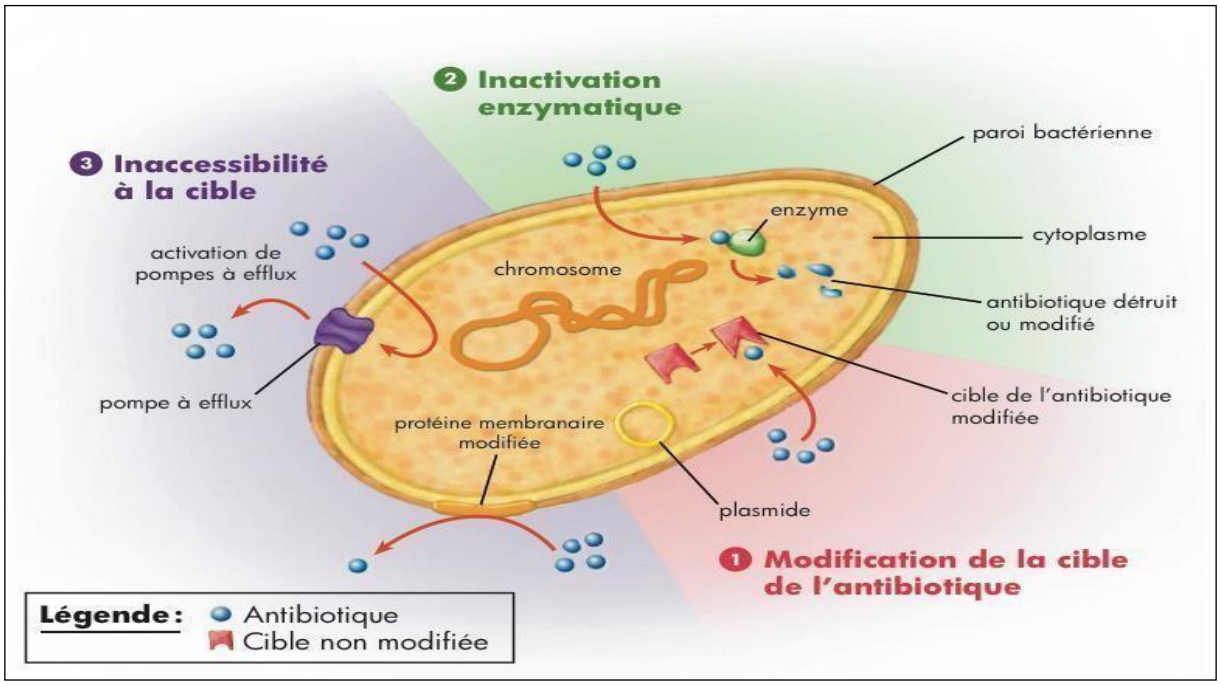


Figure 13 : Les mécanismes de résistances aux antibiotiques

2.2.1Modification de la cible de l'antibiotique :

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

- Modification des PLP

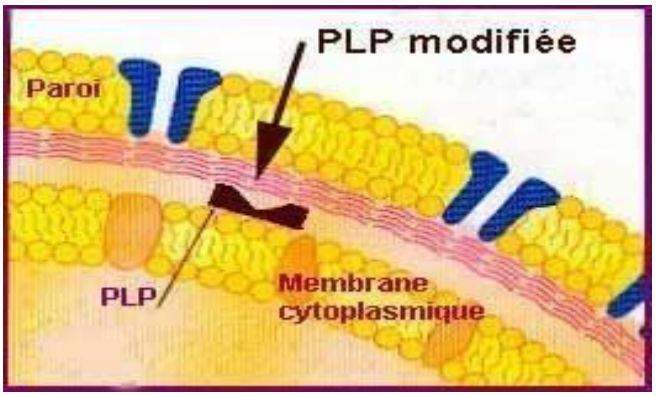


Figure 14: Le mécanisme de résistance aux ATBs par la modification des PLP au niveau de la bactérie **(Bevilacqua S, 2011).**

- Modification du précurseur de peptidoglycane;
- Modification du ribosome;
- Modification des topoisomérases;

- Modification de l'ARN polymérase;

- Modification des enzymes impliquées dans la synthèse des folates;

- Modification du facteur d'élongation.

Chaque antibiotique se lie à cette cible et bloque son fonctionnement. La modification d'affinité de la cible envers l'ATB entraîne une diminution de la liaison entre la protéine cible et la molécule ATB, ce dernier sera alors moins efficace **(Bevilacqua S, 2011).**

2.2.2 Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

La bactérie peut produire des enzymes inactivant l'action des ATBs soit à l'extérieur de la bactérie : enzyme exocellulaire, soit à l'intérieur de la bactérie : enzyme endocellulaire ou Périplasmique. Les classes d'ATBs visées par ces enzymes sont les Bêtalactamines les Macrolides-incosamides-Streptogramines (MLS), les Aminosides et les Phénicolés **(Morelière M, 2000 à 2009).**

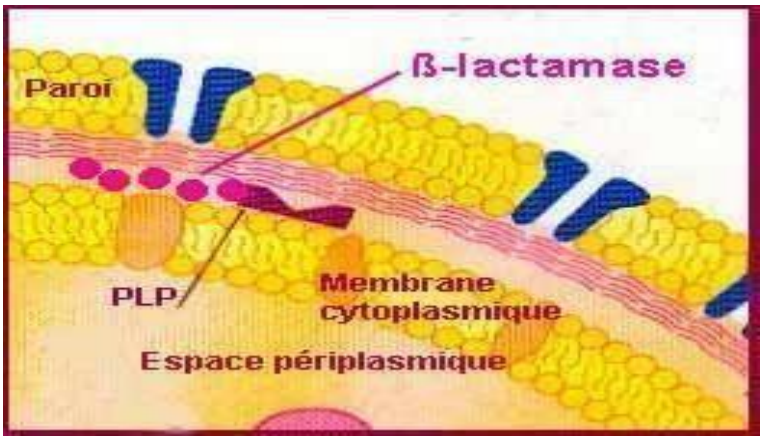


Figure 15 : L'action des enzymes ß-lactamase sur les ATBs agissant sur la bactérienne **(Morelière M, 2000 à 2009).**

2.2.3Diminution de la perméabilité :

Pour agir, les antibiotiques doivent pénétrer dans la cellule bactérienne et utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour ses échanges avec l'extérieur. Pour se défendre, la bactérie empêche cette entrée de toxiques en diminuant la perméabilité de sa membrane par :

- Une altération des porines (protéines formant les pores de la membrane) : ce mode de résistance n'affecte que les bactéries Gram négatif, chez qui la membrane externe constitue une barrière de diffusion très efficace. L'ATB ne peut traverser cette barrière qu'en empruntant des structures particulières (les porines). Toute modification des porines

rend le passage des molécules hydrophobes (comme la famille des Bêtalactamines) encore plus difficile

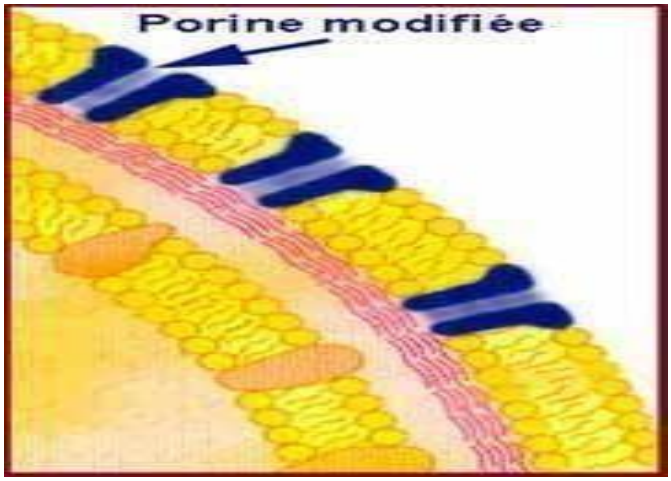


Figure 16 : Le mécanisme de résistance par modification des porines de la membrane bactérienne **(al, 2016).**

- L'absence de passage ou l'augmentation du temps de passage protège les bactéries et les rend résistantes;
- Une inhibition du transport actif;
- Une inhibition de la pénétration à travers les peptidoglycanes recouvrant la membrane plasmique chez les bactéries Gram positives;
- La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), au niveau du polysaccharide, peut aussi être à l'origine d'une diminution de la perméabilité.

Ce mécanisme n'est cependant pas très performant, car il suffit d'augmenter les doses d'ATBs pour faire face à cette baisse de la perméabilité membranaire.

Néanmoins, ce système lorsqu'il est associé à d'autres systèmes de résistance, peutprotéger de façon efficace la bactérie même à des doses importantes d'ATBs.

3. Excrétion de l'antibiotique par mécanisme d'efflux :

L'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de ce dernier vers l'extérieur de la bactérie (efflux).

Les transporteurs d'efflux de plusieurs ATBs sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux ATBs favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entrainant une hausse de la résistance bactérienne. Il est possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause d'une

exposition à un ATB d'une autre 1 classe **(A. Philippon et al, 2010).**

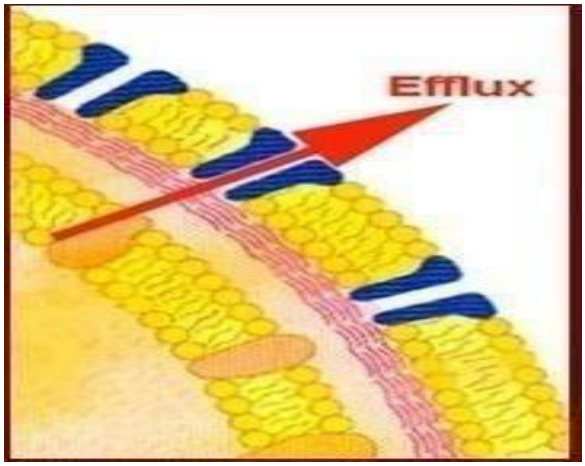


Figure 17 : Le mécanisme d'efflux exercé par la bactérie sur l'antibiotique **(A. Philippon et al, 2010).**

4. Résistance aux antibiotiques par développement de biofilms :

De nombreux problèmes sont associés au développement des biofilms en milieu médical, et ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériensque ce soit les antibiotiques ou les désinfectants. Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) ; elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus.

La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une subpopulation de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques. Cette configuration d'agglomération de colonies favorise les transferts de gènes de résistance entre bactéries. Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, les résistances bactériennes liées à la présence de biofilms échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces dès lors qu'il existe un biofilm et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini **(Ploy Marie-Cécile. (2012)).**

5. Persistance des bactéries :

Il y a persistance du germe dans l'organisme, même en présence de l'antibiotique. En effet lors d'un traitement antibiotique, une petite fraction des cellules bactériennes, dites persistantes, ne sera pas tuée. La persistance étant réversible, ces cellules persistantes

pourront revenir dans un état normal une fois le traitement antibiotique terminé. Elles auront alors la capacité de se multiplier et de générer une nouvelle infection Ce mécanisme de résistance implique la perte ou la diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène. Le métabolisme bactérien diminue alors, et les antibiotiques ciblant en général une étape du métabolisme ont peu d'effet **(Calgagno F., Lacroix R. (2011)), (Pour la science. (2013)).**

6. les mécanismes de résistances découverts récemment

6.1 La métallo-β-lactamase NDM-1

Cette enzyme a pour la première fois était identifiée en 2008 sur deux souches bactériennes provenant d'un patient suédois d'origine indienne, ayant subi une hospitalisation en Inde l'année précédente. La première souche était une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir d'un prélèvement urinaire. L'autre souche était une souche d'*Escherichia coli* provenant d'un prélèvement fécal. Ces deux souches étaient multi-résistantes aux principaux antibiotiques, et l'analyse génétique a permis d'observer la présence du gène de résistance blaNDM-1 sur des plasmides de différentes tailles, transférables in vitro entre deux souches de bactéries. Ce gène codait pour une β- lactamase structurellement très différentes des autres, mais capables de la même fonction d'hydrolyse des β-lactamines **(Karthikeyan K Kumarasamy et al. (Septembre 2010)).**

Une étude approfondie a alors été menée par des scientifiques anglais, qui ont découvert les résultats suivants entre 2008 et 2009 :

* Au Royaume-Uni, sur 73 souches d'entérobactéries produisant des carbapénémases, 32 produisaient l'enzyme NDM-1. Au total 37 souches NDM-1 ont été découvertes. La plupart des souches étaient des *Klebsiella pneumoniae*(21) et des *Escherichia coli* (7). Les prélèvements contenant ces bactéries étaient le plus souvent urinaires, mais aussi sanguins,ou encore issus de lésions, notamment de brûlures. Au moins 17 patients avaient un historique de séjour en Inde ou au Pakistan dans l'année, et sur ces patients 14 avaient séjournés dans un hôpital du pays en question.

* 143 souches d'*entérobactéries* NDM-1 ont été identifiées en Inde et/ou au Pakistan. Ces souches étaient, comme précédemment, principalement des *K. Pneumoniae* ou des *E. Coli*.L'analyse génétique de ces souches a permis de montrer qu'il s'agit d'une épidémie due à des souches différentes et que le gène de résistance avait donc diffusé.

* Ces souches sont de sensibilité aux antibiotiques variabl, mais généralement multi-résistantes, voire résistantes à tous les antibiotiques **(Karthikeyan K Kumarasamy et al. (Septembre 2010)).**

A la fin de l'année 2009, on totalisait un nombre supérieur de souches NDM-1 dans les trois pays cités (70 au Royaume-Uni, 170 en Inde et au Pakistan), **(Nordmann P. (26 novembre 2010)).**

Cette étude a été publiée en 2010. Après sa publication d'autres souches d'*entérobactéries* NDM-1 ont été découvertes dans de nombreux pays, notamment la France (2 souches), l'Allemagne, les Pays-Bas, ou encore les Etats-Unis. Ce sont essentiellement des souches de *K. pneumoniaeet* d'*E. Coli*. Ces souches sont toutes multi-résistantes, et surtout issues de prélèvements urinaires. Leur origine, le sous-continent indien, est clairement identifiée, **(Nordmann P. (26 novembre 2010)).**

Une souche d'*Acinetobacter baumanii* productrice de NDM-1 a également été identifiée en 2010 en Inde, et indique qu'il est possible ce que gène de résistance se transmette entredes bactéries de différentes espèces **(Nordmann P. (26 novembre 2010)), (Kumarasamy Karthikeyan, M. A. Thirunarayan, Padma Krishnan. (21 juillet 2010)).**

Tous ces éléments soulignent l'importance de la diffusion de cette résistance, qui est associée à des infections au taux de mortalité non négligeable. Sûrement très important dans la région indienne et au Pakistan, ce phénomène, n'a pour l'instant pas de caractère particulier de gravité pour la France. En revanche, son extension dans les années à venir est fort possible. Selon les experts, il serait bon de prendre des mesures dès maintenant, en effectuant, entre autre, un dépistage et un contrôle des porteurs sains parmi les patients hospitalsés de retour de l'étranger **(Nordmann P. (26 novembre 2010)).**

6.2 Mycobactérium smegmatis et le mécanisme de persistance dynamique

Des chercheurs suisses ont publié en 2013 les résultats d'une étude réalisée sur ce germe, proche de la bactérie responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* **(Yuichi Wakamoto et al. (Janvier 2013))**.

Ils ont découvert, après observation microscopique, que des bactéries persistaient en présence de molécule d'isoniazide, non en ralentissant leur métabolisme comme observé habituellement avec les autres bactéries, mais en continuant de se diviser.

Cependant le nombre de cellules restait stable. Ce résultat n'était qu'apparent, et était en fait l'expression d'un état dynamique équilibré entre la division de cellules et la mort

d'autres cellules. Les cellules qui résistaient à l'isoniazide sont en fait celles dont le rythme de production de l'enzyme KatG est le plus lent. Cette enzyme est une catalase-peroxydase qui active l'isoniazide, celui-ci étant une prodrogue. Les biologistes ont montré que chaque bactérie produit cette enzyme de façon intermittente et aléatoire. Des phases de production peu fréquentes favoriseraient alors la résistance du fait qu'elles ne permettraient pas d'atteindre une quantité d'antibiotique activée létale pour la population bactérienne **(Pour la science. (2013)), (Yuichi Wakamoto et al. (Janvier 2013)).**

7. La réponse SOS bactérienne : une voie efficace d'acquisition de résistance aux antibiotiques

La réponse SOS bactérienne est une réponse globale de la réparation de dommages de l'ADN. C'est un mécanisme de régulation qui permet l'adaptation et l'évolution de la bactérie quand les conditions environnementales l'exigent. C'est un système induit à la suite d'un stress causant des dommages très importants à l'ADN bactérien et permettant la réparation de cet ADN et la reprise de la réplication. Ce système est régulé par deux acteurs principaux : un répresseur (LexA), fixé à ses sites de fixation en période d'homéostasie dans la région promotrice des gènes du régulon SOS et empêchant ainsi leur expression, et des gènes activateurs (RecA). Lorsqu'un brin d'ADN est endommagé, RecA se fixe sur le fragment d'ADN et entraîne ainsi par formation d'un filament nucléoprotéique, le clivage de LexA. Ce système de régulation est composé de protéines

impliquées dans la réparation d'ADN dont les ADN polymérases. Ces dernières n'ayant pas d'activité de correction d'erreur, favoriseront l'introduction d'erreurs lors de la réparation de l'ADN et faciliteront ainsi l'émergence de mutations et l'adaptation des bactéries. De nombreux agents exogènes et endogènes peuvent induire la réponse SOS de façon indirecte ou directe (dommage à l'ADN), **(Da Re S. et Ploy MC. (Février 2012)).**

Selon l'étude de Sandra **(Da Re et Marie-Cécile Ploy, 2012**), certains antibiotiques, en ayant un effet sur cette réponse SOS seraient aussi impliqués dans l'induction, l'acquisition et le transfert de résistance. Tous les éléments cités dans les paragraphes suivants sont tirés de cette étude.

Plusieurs antibiotiques, comme la ciprofloxacine, l'ampicilline ou le triméthoprime induisent directement la réponse SOS à des concentrations sous-inhibitrices, chez certains microorganismes. Selon différentes études cela semble dépendre de la bactérie et de l'antibiotique. Par exemple, les aminosides induiront la réponse chez *Vibrio choleriae* mais pas chez *Escherichia coli* alors que la ciprofloxacine et l'ampicilline induiront la

réponse chez les deux espèces. Il est donc difficile d'établir des généralités sur les capacités d'induction de la réponse SOS par tel ou tel antibiotique chez telle ou tellebactérie.

D'autres antibiotiques, tels que des aminosides, quelques fluoroquinolones, le métronidazole, des β-lactamines, peuvent induire de façon indirecte la réponse SOS par production de dérivés réactifs de l'oxygène qui entraînent un stress oxydatif chez la bactérie et des dommages à l'ADN, et ainsi activer la réponse SOS et conduire à l'apparition de résistances.

Au final les liens entre réponse SOS et résistance aux antibiotiques peuvent être la conséquence de :

* L'augmentation de la fréquence des mutations suite à l'activation de la réponse SOS, pouvant conduire à l'apparition de la résistance aux antibiotiques par les mécanismes biochimiques vu précédemment.

* L'expression de gènes de résistance normalement réprimés par LexA

* Transferts d'éléments génétiques hébergeant des gènes de résistance :

- Induction de la capture de gènes de résistance par les intégrons : l'étude a montré in vitro que l'expression de l'intégrase était sous la régulation de la réponse SOS bactérienne induite par le trimétoprime, ou la ciprofloxacine chez *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*, ou encore par l'ampicilline chez *Vibrio cholerae*. Cette découverte n'impliquerait que le réarrangement de cassettes existantes dans l'intégron est induit lors de l'activation de la réponse SOS par les antibiotiques. Une des conséquences est qu'une bactérie peut paraître sensible à un antibiotique alors qu'elle possède la cassette permettant la résistance, car cette cassette du fait de sa position sera peu ou pas exprimée.

Sous la pression de sélection exercée par l'antibiotique, l'intégrase exprimée via la réponse SOS pourra réorganiser l'ordre des cassettes et ainsi conduire à son expression. En l'absence de stress (qui correspond ici à l'administration d'un antibiotique), le réseau de cassettes est stable et l'intégron n'intègre pas de nouvelle cassette de résistance.

-Induction de la dissémination de gènes de résistance : Il a été montré qu'un ICE trouvé chez *Vibrio cholerae*, le STX, et qui porte des gènes de résistance au sulfamethoxazole, au trimétoprime et à la spectinomycine, pouvait être transféré à la suite d'un traitement par la ciprofloxacine de la bactérie porteuse de STX selon une voie similaire à la régulation de la réponse SOS.

L'élément peut ainsi être transféré à un nouvel hôte et ses gènes de résistance peuvent être disséminés. Il a également été montré que les transferts horizontaux de gènes par

conjugaison et transformation induisaient aussi la réponse SOS chez les bactéries à Gram négatif. De ce fait, certains plasmides chez *E. coli* et *V. cholerae* sont capables d'induire, via le processus de conjugaison, la réponse SOS dans la bactérie réceptrice, et si cette dernière contient un intégron, l'intégrase sera exprimée. De la même façon, le processus de transformation induit la réponse SOS et l'expression de l'intégrase d'intégron chez des souches naturellement compétentes de *V. cholerae*. Que ce soit lors de la conjugaison ou la transformation, le transfert se fait sous forme d'ADN simple brin permettant l'activation de la réponse

SOS.

* Induction de la formation de bactéries persistantes : la réponse SOS participe à cette propriété. L'étude a montré que la ciprofloxacine induisait la formation de bactéries persistantes en réponse à l'induction sous l'action de la voie SOS d'une toxine produitepar *E. coli.*

8. La lutte contre l'antibio-résistance

8.1 Réduire la consommation d'antibiotique

La surconsommation d'antibiotiques est un des principaux facteurs responsables de l'émergence et de l'extension de la résistance aux antibiotiques. Réduire la consommationdes antibiotiques est nécessaire pour réduire la pression de sélection qui pèse sur les bactéries **(OMS. (2014)).**

8.1.1 Surveillance de la consommation d'antibiotique et de la résistance bactérienne :

La surveillance de la consommation et celle de la résistance sont deux paramètres à surveiller et à analyser en parallèle.

8.1.1.1 Surveillance de la consommation des antibiotiques :

Surveiller la consommation d'antibiotiques permet de connaître la pression qu'exercent ceux-ci et de lutter contre l'émergence des résistances aux antibiotiques. Cela fait l'objet d'une action dans le Plan national d'alerte aux antibiotiques **(Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé. (2011)).**

La circulaire n° 2006-139 du 23 mars 2006 propose une méthode de calcul homogène des consommations d'antibiotiques, basée sur la dose définie journalière (DDJ) qui s'affranchit des différences de posologies et de prix, et est internationalement reconnue et utilisée **(Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé. (2011)).**

En France, l'ANSM a publié en juin 2012 un rapport intitulé « Dix ans d'évolutions des consommations d'antibiotiques en France ». Les données ont été obtenues grâce à deux sources : les déclarations de ventes que les entreprises pharmaceutiques adressent chaque année à l'ANSM et des données complémentaires, portant sur la consommation en ville, issues d'une collaboration entre l'ANSM et (CNAMTS), **(ANSM. (Juin 2012)).** La consommation des antibiotiques en milieu hospitalier est aussi suivie par le réseau national de surveillance ATB-RAISIN mis en place en juillet 2009. Ce réseauest issu de la collaboration entre le Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin) et le Réseau de surveillance de la consommation des antibiotiques initié par les cinq Centres de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CClin). La surveillance de la consommation des antibiotiques conduite dans le cadre du réseau ATB-Raisin participe au bon usage des antibiotiques **(Gaudel Pauline. (2013)), (Cclin-Arlin. (2013)).**

En Europe, depuis le 1er juillet 2011, l'ECDC coordonne la surveillance européenne dela consommation d'antimicrobiens via le réseau European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net). Cette surveillance était auparavant réalisée par le réseau ESAC depuis 2001. ESAC-Net recueille et analyse les données sur la consommation d'antimicrobiens de l'Union Européenne, que ce soit au niveau communautaire ou dans le secteur hospitalier **(Gaudel Pauline. (2013)), (ECDC. (Novembre 2012)).**

Les différentes données déjà obtenues indiquent que la consommation d'antibiotiques tend à diminuer ces dernières années. Il est plus difficile d'obtenir des données sur les hôpitaux que sur la consommation en ville, ce qui rend plus difficile l'interprétation des résultats obtenus.

8.1.1.2 Surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques existe dans tous les pays du monde mais est particulièrement importante dans les pays où les niveaux d'hygiène sont faibles **(Inserm. (Mai 2013)).**

Au niveau Européen, il existe un véritable gradient nord-sud, avec des taux plus faibles dans les pays du Nord. La proportion de SARM varie par exemple de moins de 1 % en Norvège et Suède, à plus de 25 % dans le sud de l'Europe (Espagne, Italie, Grèce, Portugal...). Ces différences résultent notamment de stratégies de prévention de la transmission et de l'importation de bactéries résistantes, ainsi que de stratégies de maîtrise

de la consommation d'antibiotiques plus ou moins précoces et strictes **(Inserm. (Mai 2013)).**

Une des actions du Plan national d'alerte aux antibiotiques est de consolider les systèmes de surveillance existant pour les établissements de santé et de développer ceux pour la ville. Cela a pour but de mettre à disposition des professionnels, et ce dans des délais raccourcis, les données disponibles sur la résistance aux antibiotiques pour les principaux couples bactérie/antibiotique à surveiller **(Ministère du Travail, de l'Emploiet de la Santé. (2011)).**

En Europe, L'European Antimicrobial Résistance Surveillance Network (EARS-Net, anciennement EARSS) fournit des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques en santé humaine depuis 1998. Ce réseau de surveillance est coordonné par l'ECDC depuis 2010. Les agents pathogènes invasifs cibles de cette surveillance sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* depuis 1999, *Escherichia coli, Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* depuis 2001, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* depuis 2005. Les données obtenues montrent une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif sous surveillance à l'échelle européenne. La progression la plus importante concerne la résistance combinée aux C3G, aux fluoroquinolones et aux aminosides d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*. La résistance de cette dernière aux C3G était d'environ 25% en France en 2011, alors que pour *E. coli* ce taux atteignait 8%. D'ailleurs 10% des E. coli étaient résistantes aux fluoroquinolones en France en 2011. De façon générale, l'augmentation de la résistance des *entérobactéries* aux antibiotiques et particulièrement aux C3G et aux carbapénèmes est inquiétante, notamment dans certains pays comme la Grèce. A l'inverse, la résistance chez les bactéries à Gram positif semble se stabiliser voire diminuer dans certains pays, témoignant que les efforts fournis sur le plan national en matière de contrôle de l'infection et de confinement de la résistance commencent à être efficace. En ce qui concerne *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, sa proportion semble stable voire en baisse dans certains pays. Cependant, ce problème reste un sujet de santé publique prioritaire, car la proportion de SARM est encore élevée dans plusieurs pays. Selon l'OMS, en Europe, jusqu'à 60% des infections à *S.aureus* sont des SARM. Ce taux était d'environ 20% en France en 2011. Cette proportion atteindrait 90% dans certains lieux du continent américain (51,3% aux USA), et 80% dans certaines régions d'Afrique **(OMS. (2014)), (Gaudel Pauline. (2013)), (Ecdc. (Novembre 2012)), (Ecdc. (2011)).**

Le rapport de l'OMS paru en avril 2014 pointe lui aussi du doigt la proportion encoretrop élevée de SARM au niveau européen, et l'élévation des niveaux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux C3G. Il suggère que certains pays ont besoin d'urgence de

mettre en place un système de suivi des résistances. Le bureau européen de l'OMS apporte son appui à ces pays par l'intermédiaire d'un réseau nouvellement créé, le réseau CAESAE (Réseau de surveillance de la résistance aux antimicrobiens en Asie Centrale et Europe Orientale).

L'objectif de ce réseau est d'établir un réseau de systèmes nationaux pour assurer le suivi de la résistance aux antibiotiques dans les pays de l'Europe ne faisant pas partie du réseau EARS-Net, et de recueillir des données normalisées qui permettront de comparer les informations. La méthodologie de recueil des données est celle utilisée par EARS-Net afinde faciliter les travaux de comparaison et d'analyse **(OMS. (2014)).**

Pour la France, le recueil et la transmission des données font l'objet d'une collaboration entre l'InVS et d'une part le Centre National de Référence des *Pneumocoques*. (CNRP) et d'autre part l'Observatoire National de la Résistance aux Antibiotiques (ONERBA). Les bactéries multi-résistantes font l'objet d'un programme national mené par le réseau BMR-Raisin. Cela concerne les SARM et les *entérobactéries* productrices de BLSE (EBLSE). En effet ces bactéries sont fréquentes et leur potentiel pathogène se traduit par une morbidité, une mortalité et des coûts accrus. D'autre part, leur caractère commensal expose à un risque de diffusion important car les mécanismes de résistance impliqués sontaisément transférables.

La surveillance est menée par les Centres de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales et est coordonnée au niveau national en lien avec l'InVS dans le cadre du Raisin. Un rapport publié en 2011 indique que la densité d'incidence globale des SARM continue à diminuer mais à l'inverse, la densité d'incidence globale des EBLSE continue à augmenter **(Gaudel Pauline. (2013)), (BMR-Raisin. (2011)).**

8.2 Hygiène, prévention des infections, et lutte contre les infections nosocomiales

8.2.1 La lutte contre les infections nosocomiales

Avant 1988, la France accusait un retard important dans la prévention des infections nosocomiales. Depuis, la mise en place en 1988 des Comités de Lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) dans chaque établissement, l'institution en 1992 du Comité Technique National des Infections Nosocomiales (CTIN) et de cinq Centres de

Coordination Interrégionaux de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN), ainsique la création d'équipes d'hygiène dans les hôpitaux ont fait évoluer considérablement lamobilisation des professionnels de soin **(Ministère des Affaires sociales et de la Santé. (mars 2009)).**

Le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) est une instance officielle (décret n°991034 du 6 décembre 1999, circulaire n° 645 du 29.12.2000). Ses missions sont définies par la loi : prévention et surveillance des infections nosocomiales, information et formation du personnel, évaluation des actions de lutte contre l'infection nosocomiale. Le CLIN répond à un souci de transparence et de coordination. Il se réunit régulièrement et surveille les différents indicateurs suivants **(CHU Lyon).** :

* Incidence des infections du site opératoire
* Incidence des bactéries multi résistantes
* Incidence des bactériémies
* Consommation des solutions hydro alcooliques
* Consommation d'antibiotiques.

Le Comité Technique National des Infections Nosocomiales (CTIN) est une instance de proposition, de coordination et d'évaluation, constituée d'experts hospitaliers. Ce comité propose des objectifs prioritaires et des méthodologies standardisées de surveillance et de prévention au ministre. Il a été créé par un arrêté du 3 août 1992 modifié par un arrêté du 19 octobre 1995 qui a élargi sa composition à des représentants de l'hospitalisation privée**(CHU Lyon).**

Malgré les résultats déjà obtenus, des progrès restent à accomplir. Dans ce but un nouveau Plan Stratégique National 2009-2013 de prévention des infections associées aux soins a été mis en place. Il fait suite au plan 2005-2008 mais élargit la prévention des infections associées aux soins à l'ensemble du parcours de soins (établissements de santé,établissements médicosociaux, soins de villes). Dans cette optique, le plan s'articule en trois axes stratégiques **(Ministère des Affaires sociales et de la Santé. (mars 2009))** :

*Développer une politique globale de prévention des IAS.

*Mobiliser les acteurs sur la prévention et la maîtrise des IAS.

*Agir sur les déterminants du risque d'IAS.

La réussite de la mise en oeuvre de ce plan stratégique nécessite la mobilisation de tous les

acteurs de terrain. Les Agences Régionales de Santé, en liaison avec le réseau CCLIN ont un rôle primordial dans l'accompagnement des acteurs des trois secteurs de soins pour la réalisation de leurs objectifs prioritaires et dans l'élaboration du projet régional desanté.

8.3 Dans le domaine vétérinaire :

La surconsommation des antibiotiques concerne également le domaine vétérinaire et agricole. Leur utilisation massive est une des sources probables du développement de la résistance aux antibiotiques. En effet, la transmission entre l'animal et l'homme de bactéries résistantes aux antibiotiques par contact direct, par voie alimentaire, ou via l'environnement a été mise en évidence **(Anses. (Octobre 2013)).**

Au niveau international, des actions de lutte contre l'antibio-résistance ont été engagées dès les années 1990 par des organisations, telles que la Food and Agriculture Organization (FAO), l'OMS et l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale), qui recommandent aux pays d'adopter des mesures en faveur de la sauvegarde des antibiotiques. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé Animale a publié en 2004 des normes et lignes directrices sur l'appréciation des risques d'antibio-résistance secondaires à l'usage des antibiotiques chez les animaux. Et plus récemment, des lignes directrices pour l'analyse des risques d'origine alimentaire liés à la résistance aux antibiotiques ont été adoptées en juillet 2011 par la Commission du Codex alimentarius, organisation créée par la FAO et l'OMS. Au niveau européen, les différentes instances comme l'ECDC et l'Autorité européenne de sécurité alimentaire, se mobilisent également contre ce phénomène **(Gaudel Pauline. (2013)).**

Depuis 2006, l'utilisation en élevage des antibiotiques comme facteur de croissance est interdite au sein de l'Union Européenne alors qu'elle est toujours utilisée dans d'autres pays comme les Etats-Unis. Cependant, la FDA (Food and Drug Administration) a publié en 2012 un règlement limitant l'utilisation des céphalosporines chez les animaux, car elle s'inquiète que leur utilisation chez les bovins, porcs et volailles contribue au développement de souches bactériennes résistantes aux céphalosporines **(Anses. (Octobre2013)).**

8.4 La phagothérapie

8.4.1 Définition

Les bactériophages sont des virus qui infectent seulement les bactéries : ce sont des parasites intracellulaires stricts qui se multiplient à l'intérieur des bactéries en détournant toute ou une partie de la machinerie biosynthétique de l'hôte. Ils sont environ 50 fois plus

petits qu'une bactérie. On les trouve partout dans l'environnement. Bien que différents bactériophages puissent contenir différents matériaux, ils contiennent tous de l'acide nucléique et des protéines. Selon le phage, l'acide nucléique peut être soit de l'ADN soit de l'ARN mais pas les deux et il peut être présent sous différentes formes **(Mai Huong Ly-Chatain (18 février 2014)).**

8.4.2 Avantages de la phagothérapie

Le développement d'une phagothérapie antibactérienne aurait plusieurs avantages.

Les phages régulent la population des bactéries en induisant leur lyse. Ils peuvent être actifs contre diverses bactéries, des Gram négatif aux Gram positif, mais aussi sur les bactéries multi-résistantes. Au contraire d'un antibiotique, un phage est spécifique, ce qui limite son spectre à une seule espèce, voire à un ou plusieurs types au sein de l'espèce. Cet aspect permet de limiter la pression de sélection aux antibiotiques, notamment car il n'agira pas sur la flore commensale.

De plus cette thérapie présenterait moins d'effets secondaires selon de nombreuses études précliniques sur les animaux et quelques études sur des patients volontaires.

Il faudrait tout de même des études cliniques supplémentaire afin d'avoir des données de toxicité plus fournies quant à son utilisation en thérapie humaine. Un autre aspect positif est la large distribution des phages après une administration systémique. Certains seraient même capables de franchir la barrière hématoméningée, et cela permettrait une utilisation de ces agents pour traiter les infections du système nerveux central. D'autres phages auraient également la capacité de détruire des biofilms.

Enfin, l'aspect économique de la phagothérapie semble intéressant, et le coût serait moins élevé que celui d'une antibiothérapie.

Mais par-dessus-tout, la probabilité d'apparition d'une résistance bactérienne à un phage est très moindre, et même si elle peut arriver, elle n'est pas comparable avec la probabilité d'apparition d'une résistance à un antibiotique **(Wittebole X., De Roock S., Opal SM. (Janvier 2014)).**



Approche méthodologique

1. prélèvement

Les prélèvements doivent être réalisés à partir de divers sites sur patients hospitalisés (aspiration trachéale, plaie, écouvillonnage rectal, sonde urinaire, sonde gastrique et cathéter), de sujets atteinte mucoviscidose. Puis acheminés au laboratoire dans du bouillon nutritif (Fluka) pour être incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

1.1 Technique de prélèvement

La technique de prélèvement utilisée est la méthode d'écouvillonnage qui consiste à **(Zenouaki et al, 2015):**

- Frotter sur la surface sèche à analyser, l'extrémité cotonnée de l'écouvillon préalablement humidifiée à l'aide d'eau physiologique.
- Tromper l'écouvillon et agiter dans un tube contenant 10 ml du bouillon nutritif ; pour les surfaces humides, il suffit de frotter directement sans l'utilisation de l'eau physiologique.

Les échantillons ainsi prélevés ont été rapidement transportés au laboratoire de microbiologie où ils sont incubés à 37°C pendant 24 heures jusqu'à l'apparition de culture sur les milieux d'isolement **(Guiraud, 2003).**

2. Isolement et identification

Les cultures doivent être réalisées sur les milieux Mac Conkey (Bio-Rad) et Drigalski (Bio-Rad) à 37°C pendant 24 heures.

L'identification des souches doit être réalisée par, les galeries API 20NE (BioMerieux) et confirmée par le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix- Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) (Ultraflex MALDI-OF, Bruker Daltonik, Allemagne). (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2.1 Méthodologie

2.1.1 Isolement et identification phénotypique des souches bactériennes

À partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, 02 milieux de culture doivent être ensemencé **(Larpent, 1997 ; Guiraud, 2003):**

La gélose aux cétrimides qui est un milieu sélectif permettant l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P. aeruginosa.* Sur ce milieu de très nombreuses

bactéries sont inhibées par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-tri méthyl ammonium) ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif). Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

Le schéma 01 illustre l'étape d'isolement et d'identification de *Pseudomonas aeroginosa* à étudier.

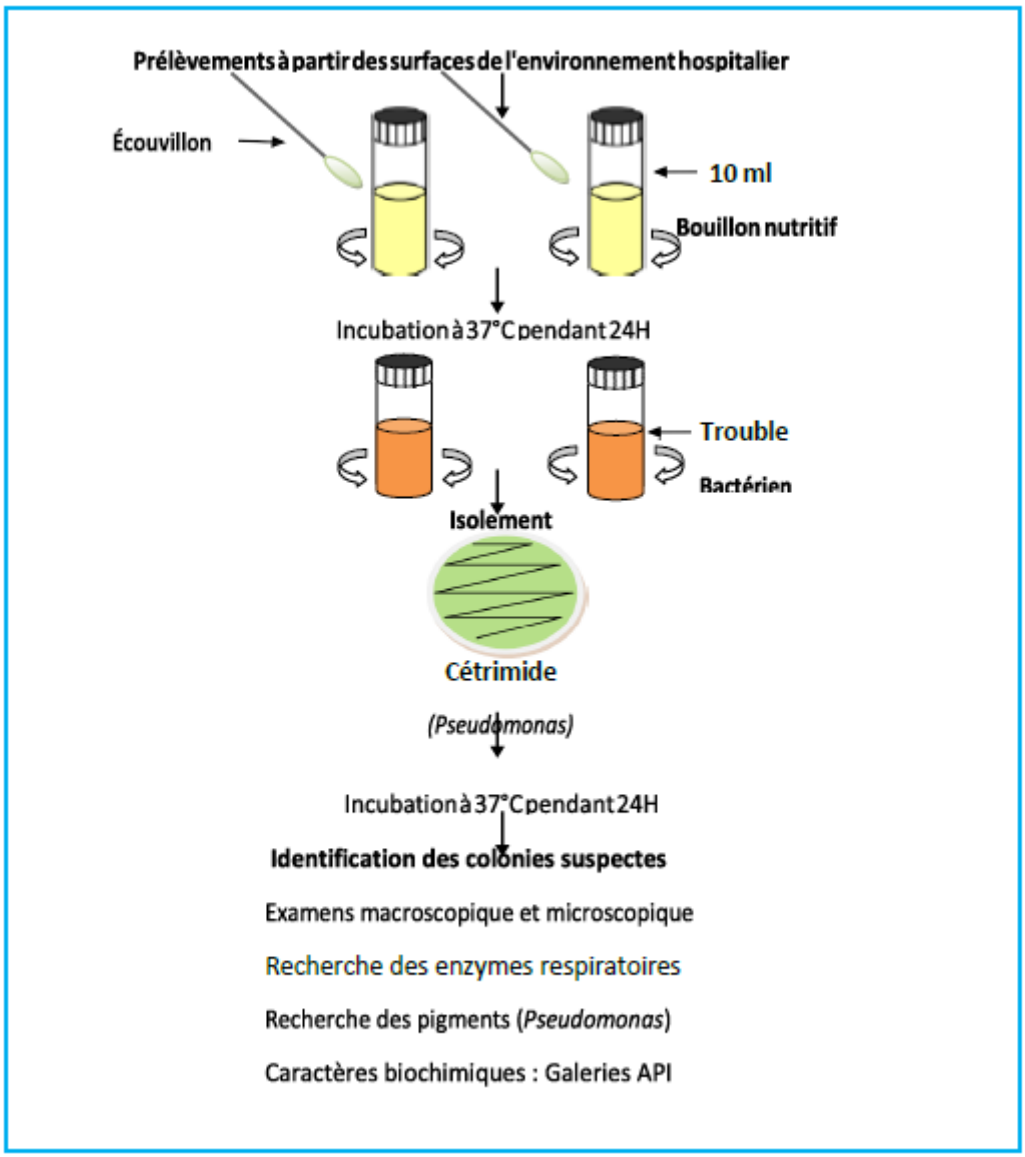


Figure 18 : Isolement et identification des souches de *Pseudomonas* **(Larpent, 1997).**

2.1.2 Identification phénotypique des souches bactériennes

2.1.2.1 Identification morphologique

***Examen macroscopique**

L'identification macroscopique des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues (la taille, la forme, la couleur,la consistance, l'opacité, l'allure du contour) **(Delarras, 2007).**

Sur la gélose aux cétrimides les colonies suspectes de *Pseudomonas* sont généralement vertes pâles présentant une fluorescence. **(Larpent, 1997).**

*** Examen microscopique**

L'aspect microscopique des bactéries isolées doit être observé par unecoloration de Gram.

*** Coloration de Gram**

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes bactériens : les Gram positif et les Gram négatif. Elle permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement des bactéries **(Degrement, 1998).**

Technique

La coloration de Gram ou coloration différentielle doit être effectuée de la manière suivante :

-Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen.

-Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendantune minute au violet de Gentiane, il est ensuite laver rapidement par l'eau courante.

-Mordançage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver àl'eau.

-Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes.

Recoloration : soumettre le frottis durant 30 secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre.

-Examiner le frottis, à immersion à l'objectif ×100.

Lecture

Les bactéries à Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont bien colorées en rose **(Prescott et al, 1999).**

2.1.2.2 Recherche des enzymes respiratoires

Deux enzymes respiratoires sont recherchées : l'oxydase et la catalase

Tableau 01 : Recherche des enzymes respiratoires

Enzyme	Propriété	Technique	Lecture	Référence
Catalase	Dégrade Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	• Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur; • Prélever un fragment de la colonie à Etudier ;	• **Catalase positive :** Apparition des bulles de gaz, la bactérie possède la catalase. • **Catalase négative :**	(Guiraud, 2003)
		• Dissocier la colonie dans la goutte.	Absence des bulles de gaz, la bactérie ne possède pas la catalase.	
Oxydase	Catalyse les réactions d'oxydo-réduction	• Déposer le disque d'oxydase sur une lame propre, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile ; • Ecraser la colonie testée sur le disque.	• **Oxydase positif:** Colonie prend une couleur violette. • **Oxydase négatif:** La colonie reste incolore, donc absence d'enzyme recherché.	(Prescott *et al.*, 1999)

2.1.2.3 Recherche des pigments

À partir des cultures pures de *Pseudomonas,* doit être recherchée deux pigments : la pyocyanine et la pyoverdine

-Inoculer les deux milieux King A et King B par une strie médiane.

-Incuber à 37°C pendant 1 à 4 jours.

Le milieu King A est destiné à favoriser sélectivement la synthèse de la pyocyanine (pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Le milieu King B est destiné à favoriser la synthèse du pigment jaune-vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonas*. Exemple : *Pseudomonas fluorescens.*

Lecture

-Couleur bleue sur le milieu King A : présence de pyocyanine.

-Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV : présence de pyoverdine. Remarque : En cas de doute pour la production de la pyocyanine, verser 0,5 ml de chloroforme à la surface de la culture sur le King A et laisser les tubes inclinés pendant 10 à 15 minutes. La pyocyanineest soluble dans le chloroforme coloré celui-ci en bleu **(Guiraud, 2003).**

2.1.2.4 Biotypage par microgalerie API

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries **(Freney et al, 2000).**

Pour les *Pseudomonas* doit être utilisée Galerie api 20NE

***Galerie API 20NE**

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est constituée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliserle substrat correspondant **(voir annexe 4).**

3. Conservation des souches bactériennes

Les 4 souches bactériennes doivent être purifiées par des repiquages successifs et conservées jusqu'à l'étude de la résistance aux antibiotiques. Laconservation des souches doit être réalisée à la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive inclinées en tubes à essai **(Guiraud, 2003).**

4. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of Flight Mass Spectrometry method) (Seng et al., 2010)

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonic, Bremen, Germany) est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol. La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligo nucléotides. L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre **(voir annexe 3).**

5. Détermination des cinétiques d'adhésion bactériennes par le biofilm Ring Test

Le système du Biofilm Ring Test permet d'étudier les étapes précoces de développement d'un biofilm bactérien **(Chavant et al, 2007).** Son principe de fonctionnement consiste à visualiser le déplacement macroscopique de microbilles magnétisables le long d'une surface, sous l'action d'un aimant (Figure 19). Concrètement, une solution bactérienne est mélangée à une suspension de particules magnétiques avant d'être déposée dans les puits d'une microplaque standard de laboratoire. Cette dernière est alors incubée et des mesures directes de cinétique d'adhésion sont effectuées, sans aucune étape de lavage ni de marquage. En effet, l'application d'un support aimanté sous la microplaque va engendrer un champ magnétique agglomérant les billes en un spot visible au fond des puits. Le test consiste ainsi à suivre l'immobilisation de ces particules au fur et à mesure de la formation d'un biofilm. En effet, lors de l'adhésion des bactéries au support, les billes magnétiques vont être piégées par le tapis bactérien et ne pourront plus se déplacer sous l'attraction de l'aimant (absence de spot). La lecture du fond des puits de la microplaque se fait à l'aide d'un lecteur spécifique conçu

parbiofilm Control: le biofilm reader. Une analyse d'images à l'aide du logicielBFC éléments génère un score d'agrégation des billes, l'indice biofilm (BFI), pour chacun des puits analysés. Grâce au suivi de l'indice BFI, il est alors possible d'identifier en moins de 24h les souches bactériennes capables d'adhérer et de former un biofilm au fond des puits de la microplaque.

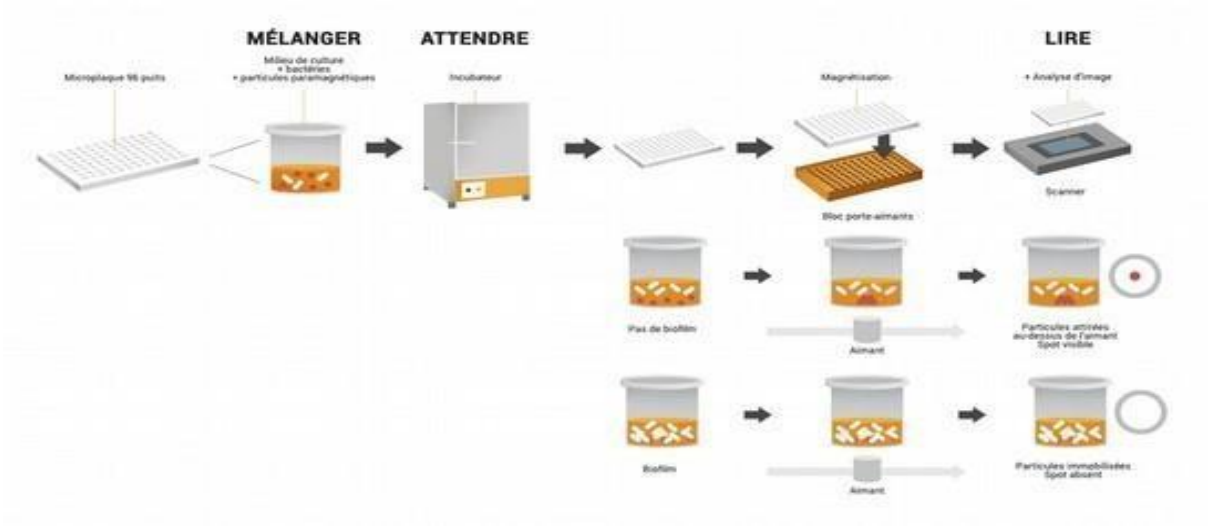


Figure 19 : Technologie du Biofilm Ring Test **(Chavant et al, 2007).**

6. Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet

Avoir recours au marquage au Cristal Violet pour la quantification du biofilm bactérien reste, à l'heure d'aujourd'hui, la technique la plus fréquemment utilisée au laboratoire en microplaques 96-puits. Basé sur la spectrophotométrie, le principe de cette méthode, qui quantifie la biomasse totale du biofilm, repose sur le marquage des cellules adhérentes par le CV **(O'Toole, 2011; Stepanović et al, 2000).** La mesure de l'absorbance de la culture bactérienne analysée reflète ainsi sa capacité à adhérer et donc à former un biofilm au fond des puits de la microplaque. Tout comme pour les expérimentations menées avec le BRT, l'effet des antibiotiques sur la prévention de l'adhésion bactérienne peut être évalué par la technique du CV, en les ajoutant à la suspension bactérienne initiale à différentes concentrations. Les nombreux inconvénients relatifs à cette méthodologie (longue incubation des microplaques, faible reproductibilité des résultats, étapes de lavages contraignantes…), empêchent cependant sa standardisation pour une utilisation en routine hospitalière.

7. Imagerie cellulaire

7.1 Microscope à épifluorescence

Après marquage au calcofluor, les co-cultures statiques cellules/bactéries sontobservées au microscope à épifluorescence. L'appareil utilisé est un Olympus BX60 avec, pour source lumineuse, une lampe HBO. L'objectif (Olympus) utilisé est le x40 à immersion. Le filtre UV est appliqué pour visualiser la fluorescence bleue du marqueur. Finalement, une caméra Orcaflash 4.0 (C11440, Hamamatsu, Massy, France) permet de capturer les images grâce au logiciel HC Image Live (Hamamatsu).

7.2 Traitement des images

Après acquisition, les images sont analysées grâce au logiciel libre Image J, afin de procéder à une localisation subcellulaire du calcofluor. Pour cela, il fautqu'initialement, deux photographies aient été prises sur le même champ microscopique à l'aide de deux jeux de filtres différents (phase de contraste et UV). Le logiciel de traitement d'images permet alors la fusion des deux clichés. Cette superposition reflète ainsi, en couleurs factices, la fluorescence bleue du calcofluor sur l'image initiale restituée en niveaux de gris.

8. Etude de la résistance aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques doit être réalisée par la méthodeclassique de diffusion des disques d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie **(CA-SFM, 2020).**

8.1 Technique de l'antibiogramme

Préparation de l'inoculum

-À partir d'une culture pure de 18 à 24 H sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitementidentiques.

-Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml de bouillon Mueller Hinton.

-Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalenteà 0,5 Mc Ferland (~ 108 UFC/ml).

- **Ensemencement de la gélose Mueller Hinton (MH)**

-Couler la gélose MH en boites de Pétri, Laisser sécher et solidifier sur paillasse avant utilisation.

-Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé (~ 106 UFC/mL pour lesBacillus et ~ 107 UFC/mL pour les *Pseudomonas*).

-L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne dutube, afin de le décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées.

-Répéter l'opération 2 fois en tournant la boite de 60° à chaque fois, sans oublierde faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose.

-Laisser les boites ensemencer 15 à 20 min sur paillasse ou dans l'étuve à 37°C avant l'application des antibiotiques.

- **Application des disques d'antibiotiques**

-Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose à l'aide d'une pince flambée,en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

-Laisser les boîtes à une température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose.

-Incuber (sans dépasser les 30 minutes) à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures**.**

- **Lecture interprétative**

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse en millimètre, puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux indications d'Institut pasteur production. Il convientde noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante"

8.2 Antibiotiques testés

Les antibiotiques qui doivent être testés sur les différentes souches bactériennes sont représentés dans le tableau 02.

Le choix des antibiotiques testés repose sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques (résistances naturelles et résistances acquises possibles).

Tableau 02 : Critères des antibiotiques testés sur les souches bactériennes **(IPP,1981).**

Genre bactérien	Antibiotique	Famille d'antibiotique	Classe	Code	Chargedu disque	Diamètres critiques (mm) S ≥	R <
Pseudomonas	Colistine	Polymyxine	Pénicilline	CT	10Unité	15	-
	Ceftazidime	Bêta –lactamine	Céphalosporine	CAZ	30	21	15
	Chloramphénicol	Aminoglycoside	Divers	C	30	23	19
	Céfazoline	Bêta –lactamine	Céphalosporine	CZ	30	18	12
	Vancomycine	Glycopeptide	Glycopeptide	VA	30	17	-

9. Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides

9.1 La tobramycine et l'amikacine retardent l'adhésion et la formation de microcolonies dans l'isolat de fibrose kystique de *Pseudomonas aeruginosa*

Comme il a déjà pu être proposé le BRT, en tant que nouvel outil de diagnostic, semble pouvoir s'incorporer facilement dans la routine d'un laboratoire hospitalier. La réalisation d'un Antibiofilmogramme, appréciant la cinétique d'adhésion d'un prélèvement bactérien sessile en contact de diverses concentrations d'antibiotiques, fournirait des données complémentaires à l'antibiogramme standard, affinant ainsi la sélection thérapeutique.

Ils ont donc procédé à la réalisation d'Antibiofilmogrammes sur certaines de souches cliniques appartenant au profil d'adhésion 2, afin de tester l'impact, à diverses concentrations, de deux aminosides sur l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne. En effet, l'amikacine et la tobramycine demeurent actuellement des molécules de premier choix pour le traitement des infections chroniques pulmonaires contractées au cours de la mucoviscidose. La méthodologie du BRT a également été comparée à la méthode plus conventionnelle de marquage du biofilm au CV.

Finalement, il a aussi été proposé de tester l'effet des aminosides sur un biofilm développé par l'intermédiaire d'un modèle cellulaire clinique afin de vérifier que le

comportement des bactéries aux antibiotiques n'était pas une réponse spécifique de l'adhésion microbienne à une surface abiotique.

10. L'antibiofilmogramme ou l'évaluation de l'effet desantibiotiques sur la formation du biofilm bactérien

Une application supplémentaire du système BRT consiste en la caractérisation de la cinétique d'adhésion d'une souche bactérienne, en présence de différentes concentrations d'antibiotiques (Antibiofilmogramme). En permettant de passer au crible les molécules ayant un effet potentiel sur la formation du biofilm, il aide à la détermination de la Concentration Minimale d'Inhibition du Biofilm (CMIb) des antimicrobiens.

Toutes les étapes du protocole de l'Antibiofilmogramme sont identiques à celles de l'évaluation de la cinétique d'adhésion d'une souche bactérienne. Seul l'ajout d'antibiotiques, lors de la préparation des microplaques, diffère. Toujours

à l'aide du suivi de l'indice BFI, il sera possible d'identifier en moins de 24h, les molécules d'antibiotiques susceptibles de retarder voire d'inhiber complètement la formation d'un biofilm, en comparaison de l'adhésion spontanée de la souche analysée. Les points techniques de la réalisation d'un Antibiofilmogramme seront énoncés brièvement, compte tenu de leur similarité à ceux détaillés précédemment pour la détermination d'une cinétique d'adhésion simple.

11. Induction de la formation de biofilm par les β-lactamine

11.1 *P. aeruginosa* Antibiofilmogram révèle le rôle du β-lactame

L'exposition des bactéries à des concentrations sublétales d'antibiotiques a déjà été décrite comme pouvant altérer leur métabolisme, voire même modifier leur comportement intrinsèque, en favorisant l'expression de certains déterminants de virulence. Dans le contexte de la mucoviscidose, la conséquence pour les patients, qui sont constamment sous des concentrations variables d'antibiotiques, est donc la sélection de souches pyocyaniques tolérantes aux antimicrobiens, par l'induction directe d'un biofilmrésistant, et donc le passage à la chronicité de la maladie.

Toujours par l'intermédiaire de la technologie du BRT, ils ont investiguer l'effet des β- lactamines sur deux souches *P. aeruginosa* appartenant au profil d'adhésion 3 (maintien d'un état planctonique).ils ont alors jugé pertinent de tester, en plus des concentrations subCMI, l'effet de concentrations standards telles que la CMI, mais aussi

plus fortes, comme la PK/PD, afin d'évaluer la réponse dose dépendante des cellules bactériennes aux antimicrobiens. La sensibilité aux antibiotiques de souches témoins cliniques a également été vérifiée par la technique de marquage conventionnelle au CV. Finalement, pour confirmer que les β-lactamines jouent un rôle sur l'initiation de la formation de biofilms par les bactéries, il a été proposé d'ajouter aux cultures bactériennes, additionnées d'antibiotiques, de la DNase I lors de la répétition de certains Antibiofilmogrammes L'activité de cette enzyme, capable de dégrader l'ADN extracellulaire qui n'est autre qu'un des composants majeurs de la matrice du biofilm bactérien, peut conduire à l'inhibition de l'adhésion précocedes cellules bactérienne.


Etude comparative des
résultats antérieurs

12. Isolement et identification phénotypique des isolats bactériens

Après la caractérisation et l'identification des isolats bactériens, 04 souches ont été rattachées au *Pseudomonas aeroginosa.* Les quatre souches de *Pseudomonas* sont isolées à partir des prélèvements P3, P7, P10 et P15.

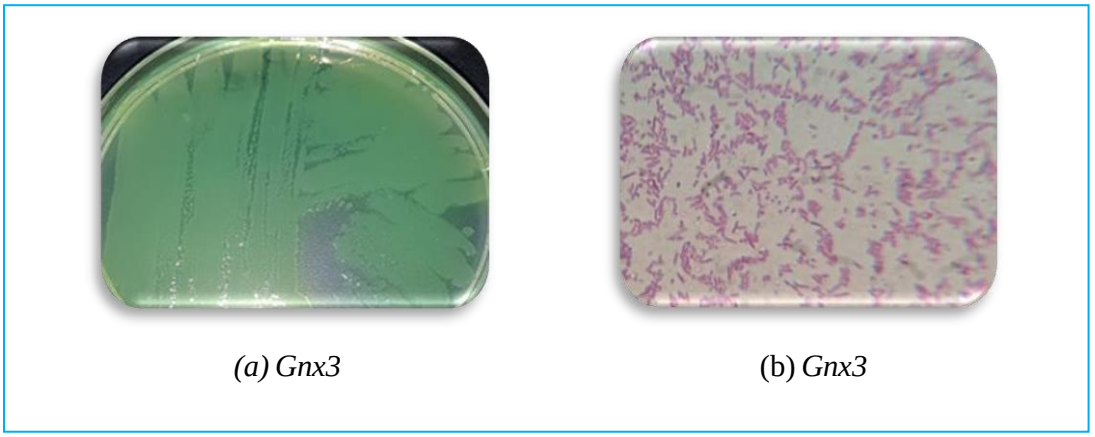
12.1 Identification morphologique

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies suspectes des *Pseudomonas* sont représentés dans le tableau 03.

Tableau 03: Aspects macroscopiques et microscopiques des *Pseudomonas* isolés à partir de l'environnement hospitalier de certains établissements publics de la région de Guelma.

Site de prélèvement	Genre bactérien	Code de la Souche	Milieu de Culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
P3	*Pseudomonas*	Gnx1	Cétrimide	Colonies moyennes crémeuses, bleues-vertes, aplaties, à contours réguliers.	Bacilles courts isolés à Gram négatif.
P7		Gnx2			
P10		Gnx3			
P15		Gnx4			

Les aspects macroscopiques et microscopiques des souches Gnx3 sont illustrés dans lafigure 20.



(a) Gnx3 (b) *Gnx3*

Figure 20 : *(a)* Aspects macroscopiques et *(b)* microscopiques de certains isolatsbactériens.

12.2 Enzymes respiratoires

Lesrésultatsobtenusdelarecherchedesenzymesrespiratoiressontreprésentésdans le tableau 04.

Tableau 04 : Recherche des enzymes respiratoires des isolats bactériens.

Code de la souche Bactérienne	Catalase	Oxydase
Gnx1	+	+
Gnx2	+	+
Gnx3	+	+
Gnx4	+	+

(+) : test positif (-) : test négatif

La figure 21 illustre l'aspect des tests positifs et négatifs des enzymes respiratoiresRecherchées

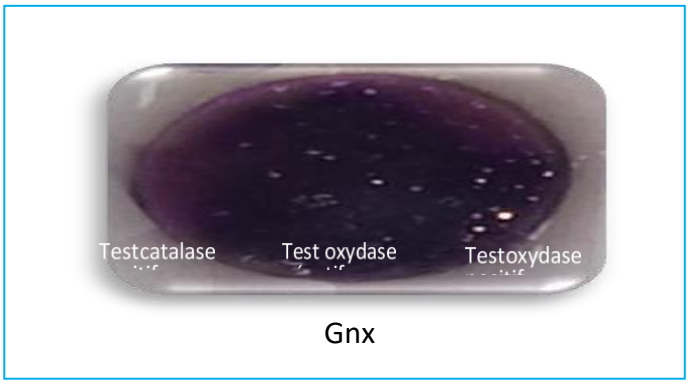


Figure 21 : Présence et/ou absence des enzymes respiratoires chez certains isolats bactériens

12.3 Recherche des pigments de *Pseudomonas*

Toutes les souches de *Pseudomonas* isolées sont productrices de la pyocyanine et de la pyoverdine. La présence de ces pigments diffusibles doit être confirmée par l'apparition de la couleur bleue et verte sur toute la pente du milieu King A et King B respectivement.

12.4 Biotypage par microgalerie API

Les résultats des caractères biochimiques des isolats obtenus sont représentés dans le tableau 04.

Tableau 05 : Profils biochimiques des isolats bactériens sur les galeries miniaturiséesAPI**.**

API Système	Souche	Profil biochimique	Code de l'API	Degré de parenté (%)
API 20 NE	Gnx 1		5554575	96,8
	Gnx2		5554575	96,8
	Gnx3		1154575	99,8
	Gnx4		1150475	98,7

❖ D'après les résultats d'identification, les espèces isolées à partir des milieux hospitaliers étudiés sont les suivantes (Tableau 06) :

Tableau 06: *Pseudomonas*isolésàpartirdel'environnementdesétablissements publics hospitaliers de la région de Guelma.

Prélèvement	Code de l'isolat bactérien	Espèce identifiée
P3	Gnx1	*Pseudomonas aeruginosa*
P7	Gnx2	*Pseudomonas aeruginosa*
P10	Gnx3	*Pseudomonas aeruginosa*
P15	Gnx4	*Pseudomonas aeruginosa*

12.5 MALDI-TOF MS

Identification des bactéries sont donnés, sous Biotyper RTC, par un score entre 0 à3 (Tab07).

Tableau 07 : Score d'identification des bactéries

Score	**0-1.7**	**1.7-1.9**	**1.9-3**
Couleur	Rouge	Jaune	Vert
Identification bactérienne	Aucune	Genre bactérien	Espèce bactérienne

L'identification d'un germe est validée lorsque le score est supérieur à 1,9 pour les 2 dépôts (même germe retrouvé). Retenir le meilleur score d'identification MS de chaque échantillon. Si l'un des deux scores de l'échantillon est inférieur à 1,9 ou si l'on retrouve 2 germes différents, l'identification n'est pas valide. Déposer cet échantillon sur deux positions supplémentaires et relancer son analyse.

12.6 Détermination des cinétiques d'adhésion bactériennes par le biofilm ring test

L'ensemble de collection clinique de souches *P. aeruginosa* doit être analysé, pour sa capacité propre à former un biofilm, par l'intermédiaire du BRT. Les différentes cinétiques d'adhésion récoltées ont alors permis la définition et le classement des souches en trois groupes majeurs, dépendant de la vitesse de l'initiation de la formation d'un biofilm par les bactéries. Concrètement, sur les vingt-cinq souches analysées, sept d'entre elles ont été placées dans le profil d'adhésion 1, défini par une adhésion forte et rapide des cellules bactériennes (blocage des billes magnétiques, soit formation d'un biofilm, en moins de 2h d'incubation). La majorité des souches ont, quant à elles, été catégorisées comme formant un biofilm de manière progressive sur 24h (profil d'adhésion 2). Finalement, seulement quatre souches de la collection ont semblé conserver un phénotype planctonique au cours des expériences menées et ont donc été classées dans un troisième profil d'adhésion (libre mouvement des billes jusqu'à 24h d'incubation).

Cette catégorisation de souches cliniques, en fonction de leur capacité à initier la mise en place d'un biofilm, a également été confirmée, pour chaque temps de cinétique mesuré, par la méthode plus conventionnelle du marquage des bactéries adhérentes au CV. De plus, l'utilisation de différents jeux de billes (variation du diamètre) et milieux de culture (utilisation du milieu MH recommandé pour la réalisation d'antibiogrammes standards), par

rapport au protocole initial, a conduità l'obtention d'une classification similaire des souches bactériennes, renforçant ainsi la prédictibilité du BRT.

12.7 Etude de la résistance aux antibiotiques *(Pseudomonas)*

L'antibiogramme des *Pseudomonas* montre une résistance totale à la colistine, laceftazidime et à la céfazoline (100%), suivi par une résistance à la vancomycine et au chloramphénicol (75%). Les résultats obtenus montrent que les souches de *Pseudomonas* résistent à 3 et/ou à 5 antibiotiques en présentant 2 profils antibiotypiques (Tableau 08)

Tableau 08 : Profils antibiotypiques associés aux souches de *Pseudomonasaeruginosa*.

Profils de résistance	**Nombre d'antibiotiques**	**Nombre des souches**	**Souches résistantes**
CT/CAZ/CZ	3	1	Gnx4
CT/CAZ/C/CZ /VA	5	3	Gnx1, Gnx2, Gnx3

CT : Colistine ; CAZ : Ceftazidime ; CZ : Céfazoline ; C : Chloramphénicol ; VA: Vancomycine

Les résultats de l'antibiogramme des isolats de *Pseudomonas* sont illustrés dans la figure 22

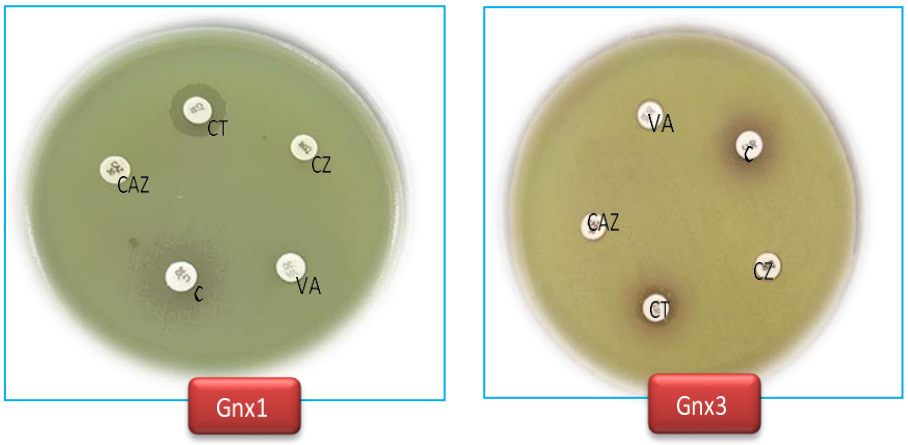


Figure 22 : Antibiogramme des différents isolats de *Pseudomonas*

12.8 Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides

L'analyse de deux souches cliniques *P. aeruginosa*, spontanément productrices de biofilm sur 6h d'incubation, en Antibiofilmogrammes, a révélé que l'amikacine et la tobramycine étaient capables de retarder l'adhésion bactérienne, à diverses concentrations. Pour la proposition d'une comparaison inter-méthodes, la technique de marquage des cellules adhérentes au CV a été appliquée. Le même potentiel inhibiteur des aminosides sur la formation du biofilm doit être retrouvée lors de l'analyse de deux souches *P. aeruginosa*. Finalement, afin de se rapprocher au mieux de la réalité pathologique de la mucoviscidose, ils ont mis au point un système de co-culture tissulaire permettant à isolats cliniques de croître sous forme de biofilm, directement à la surface de cellules épithéliales pulmonaires mucoviscidosiques. Spontanément, les souches cliniques ont été capables d'adhérer au tapis cellulaire et d'y former des microcolonies à structure tridimensionnelle. L'application de ce modèle cellulaire de co-culture statique permet la quantification de la biomasse bactérienne adhérente, mais également le marquage et la visualisation microscopique par fluorescence du biofilm. Là encore, l'amikacine et la tobramycine ont montré un effet délétère sur la viabilité bactérienne et la formation d'une matrice extracellulaire protectrice.

12.9 Induction de la formation de biofilm par les β-lactamines

Les cinétiques d'adhésion de deux isolats cliniques planctoniques de *P. aeruginosa*, obtenues par Antibiofilmogrammes, démontrent que l'adhésion des micro-organismes peut être stimulée par de nombreuses concentrations de β- lactamines. En comparaison des données préalablement décrites dans la littérature, les résultats semblent indiquer que le potentiel inducteur des antibiotiques n'est pas exclusivement réservé aux doses inférieures aux CMI. L'acquisition d'un phénotype sessile par *P. aeruginosa*, suite à un contact avec des molécules antimicrobiennes, également conduits à documenter l'aspect réversible de l'induction. Toujours par l'intermédiaire de la méthodologie du BRT, ils ont donc récupéré les cultures bactériennes stimulées et ont déterminéleur nouvelle cinétique d'adhésion spécifique, sans la présence d'antibiotiques dans le milieu. Les résultats obtenus ont alors montré que les cellules bactériennes étaient capables de retrouver, très rapidement en absence d'antimicrobiens, leur comportement planctonique original. L'effet des β- lactamines sur le comportement adhésif de souches a également été évalué parla méthode colorimétrique du CV. (En comparaison de l'Article 2), aucune corrélation de résultats n'a pu être mise en évidence entre cette technique et celle du BRT. Le processus d'induction de la formation de biofilm par les antibiotiques n'a pas été détecté via la méthodologie du CV. Cette initiation de l'adhésion bactérienne reflétant

probablement l'étape précoce de la formation du biofilm, il est probable que ce processus soit sous-évalué par la technique duCV, pour des souches faiblement adhérentes. Pour confirmer cette hypothèse, ils ont donc réalisé de nouveaux Antibiofilmogrammes en supplémentant les cultures bactériennes de DNase I, cette enzyme ayant déjà été décrite comme une molécule anti-biofilm. Par le clivage de l'ADNe constituant la matrice et les adhésines de surface cellulaires, son addition aux suspensions bactériennes a permis de mettre en évidence l'adhésion précoce des micro-organismes, initialement induite par la présence des différentes concentrations d'antibiotiques dans le milieu.

13. Discussion

La colonisation du milieu hospitalier par des bactéries pathogènes et résistantes est un problème majeur de santé publique extrêmement préoccupant, dont les conséquences se mesurent en termesde la diffusion des infections nosocomiales. En effet, il doit être constaté que, dans des situations endémiques et épidémiques, il y a une contamination environnementale et un transfert des bactéries entre les patients et l'environnement **(Oliveira *et al*, 2010).** Isolé 4 souches de : *Pseudomonasa eruginosa.*

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, morphologiquement tous les isolats sont des bâtonnets isolés à Gram négatif, ils sont positives pour la catalase et l'oxydase.

L'identification définitive de l'espèce, *Pseudomonas aeruginosa*, comprenant l'identification de la production des pigments et les caractères biochimiques est en accord avec la littérature **(Nyaledome, 2016 ; Meradji, 2017).**

Les souches de *P. aeruginosa* doivent être isolés de lavabo, de drain d'évier, mur de sanitaire et de robinet, ceci pourrait s'expliquer par leur capacité à croître dans des conditions humides avec des nutriments simples et en raison de leur capacité à résister à des agents antibactériennes et désinfectants **(Milind et al, 2014).** Les résultats sont similaires à ceux retrouvés par **(Ghane et al. (2014).**

(Lashéras et al. (2006) rapportent que *P. aeruginosa* été classé comme le microorganisme le plus fréquent qui semble survivre particulièrement bien dans les milieux humides, notamment les points d'eau (lavabos et siphons) d'où l'intérêt de la désinfection régulière de ces sites.

La nature, exogène ou endogène, des sources de contamination par *P. aeruginosa*,est encore très discutée. **Floret et al, (2009)** ont suggéré que l'origine de *P. aeruginosa* dans l'environnement hospitalier est majoritairement les patients porteurssains.

Cependant, plusieurs agents pathogènes majeurs nosocomiaux sont éliminés par les patients et contaminent les surfaces de l'hôpital à des concentrations suffisantes pour la transmission, survivent pendant de longues périodes, persistent malgré les efforts de désinfection, et peuvent être transférés aux mains des personnel de santé
(Otter et al, 2011). La transmission de *P. aeruginosa* des éviers aux mains pendant le lavage de ces derniers doit être démontrée ; D'autres recherches ont également montré que lorsque l'évier était utilisé pour le lavage des mains, le contenu du drain éclaboussé à au moins 1

mètre de l'évier et polluait l'eau infecte les patients **(Hota etal, 2009).**

La contamination par *P. aeruginosa* peut provoquer diverses infections nosocomiales en raison de sa capacité à survivre en milieu hospitalier et à développer une résistance aux antibiotiques et aux désinfectants **(Milind et al, 2014).** Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, respiratoires et urinaires et des otites externes pouvant être mortelles chez les diabétiques. *P. aeruginosa* peut aussi engendrer des kératites ulcéreuses chez les porteurs de lentilles de contact, des infections de la peau, des plaies et des infections secondaires des brûlures **(Lazdunski., 2003 ; Mesaros et al, 2007).**

Le Biofilm Ring Test a démontré sa capacité à évaluer rapidement les cinétiques d'adhésion spécifiques de souches *P. aeruginosa* cliniques et a ainsi permis de mettre en évidence différents comportements bactériens concernant la formation de

biofilms. Cette notion de profils d'adhésion, en fonction du temps d'incubation final appliqué, suggère que la cinétique de formation d'un biofilm peut varier d'une espèce bactérienne à l'autre, mais également d'une souche à l'autre au sein de la même espèce.

Sur le plan technique, le BRT est très praticable. La robustesse de ce nouvel outil s'est également confirmée par une très bonne reproductibilité et l'obtention de résultats en quelques heures seulement. Ces qualités sont indispensables à une technologie dont on peut envisager le passage en routine à court terme.

De par son principe de fonctionnement (mesure du blocage des microbilles paramagnétiques au cours de l'étape précoce de formation du biofilm), le BRT ne permet pas l'obtention d'informations concernant la structure ou l'épaisseur d'un biofilm mature. Dans ce sens, son application est surtout utile à la mise en évidencede l'adhésion bactérienne et de sa cinétique, plutôt qu'à la caractérisation des étapes tardives de formation et de maturation du biofilm bactérien.

De façon générale, il faut garder à l'esprit qu'avoir recours à une méthode d'analyse in vitro, utilisant un milieu de culture riche et un support abiotique, bien qu'essentiel dans une démarche de recherche scientifique, ne peut refléter l'environnement naturel et donc le comportement spontané des micro- organismes. En effet, de récentes analyses transcriptomiques ont établi l'absence de régulons de gènes spécifiques à la croissance biofilm, suggérant que sa formation est majoritairement gouvernée par des réponses adaptatives et par les conditions environnementales **(Ciofu et al., 2015; Whiteley et al., 2001).**

La méthodologie du BRT a été initialement développée pour le criblage rapide de molécules biocides contre des micro-organismes sessiles. Après l'appréciation de leur cinétique d'adhésion spontanée, l'extension du champ d'application du BRT permet d'évaluer l'effet des antimicrobiens sur le comportement adhérent des isolats bactériens cliniques analysés. L'objectif est alors, en comparaison des CMI standardsobtenues au bout de 24h minimum, de déterminer en quelques heures les concentrations de prévention de formation du biofilm des antibiotiques. Les Antibiofilmogrammes, complémentaires et bien souvent plus relevant d'un point de vue clinique, devraient pouvoir s'incorporer facilement en routine de diagnostic, aux côtés des antibiogrammes traditionnels.

Les *Pseudomonas* présentent des taux de résistances remarquables aux β- lactamines (ceftazidime et céfazoline) ce qui peut être expliqué par la surproduction de la céphalosporinase AmpC associée à une imperméabilité et/ou une surexpression d'efflux **(Cavallo et al, 2002).** Les résultats sont comparables à ceux rapportés par Réa-raisin **(2013)** qui a montré une résistance importante des *Pseudomonas* au ceftazidime.

La résistance au chloramphénicol est due probablement à une réduction de la perméabilité membranaire de l'antibiotique, une mutation sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien ou à la présence d'une enzyme appelée chloramphénicol acétyltransférase **(Courvalin et al, 2006).** Les résultats sont très inquiétants parceque le chloramphénicol est un antibiotique qui peut provoquer une aplasie médullaireirréversible et il est interdit d'utilisation (Courvalin, 2008). Les résultats signifient que cet antibiotique est encore utilisé.

La résistance importante des *Pseudomonas* isolés à la colistine peut être résultée d'une modification de lipopolysaccharides (LPS). En effet, la fixation de la colistine à la membrane externe est rendue possible grâce à des interactions électrostatiques entre les cations et les groupements négatifs portés par le LPS, la colistine franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite des composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatale pour la bactérie **(Vettoretti, 2009)**. Le résultat se diffère à celui rapporté par **Landman et al. (2005).**

La vancomycine est un antibiotique utilisé pour traiter diverses infections nosocomiales **(Rayner et al., 2005 ; Liu et al., 2011),** mais elle n'est pas un choix principal pour le traitement des cas de *P. aeruginosa*, sa prescription élevée a provoqué l'apparition de niveaux de résistance excessifs **(Leekha et al., 2011).** En effet, cette résistance due à une surexpression d'une protéine de la membrane externe,oprF, qui protège le LPS de se lier aux antibiotiques **(Gilleland et al., 1989).** Les résultats sont comparables à ceux rapportés par **Ahmadi et al. (2016).**

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont multirésistantes (résistance au moins à trois classes d'antibiotiques actifs).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est le fruit de multiples facteurs, dont la consommation importante **(Goossens et al., 2005)** et mésusage des antibiotiques **(Guillemot et al., 1998).** En général les services ou les hôpitaux qui consomment le plus d'antibiotiques ont la plus forte prévalence de bactéries résistantes **(Ballow et al., 1992).**

Les antibiotiques se comportent comme des mutagènes aléatoires responsables de la résistance à diverses classes d'antibiotiques. La résistance, soit par mutation soit par acquisition de gêne exogène, peut être dramatiquement augmentée par la présence de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement des bactéries**(Chow et al., 1991 ; Meyer et al.,1993).** Les conditions sanitaires inadéquates et les mauvaises pratiques de prévention et de contrôle des infections contribuent à l'émergence et encouragent la propagation des bactéries multirésistantes **(Jyoti et al.,2014).**

Malheureusement, la multi-résistance peut rendre difficile le traitement de certaines infections qui nécessitent le recours à une antibiothérapie très prolongée, comme elle peut déclencher l'utilisation de thérapies plus coûteuses car les agents pathogènes sont devenus résistants aux médicaments disponibles dans le commerce **(Fishbain et al., 2010 ; WHO, 2014).**

Réduire le délai de rendu des résultats et fournir aux cliniciens l'information dont ils ont besoin pour optimiser le traitement des patients est une priorité essentielle des laboratoires hospitaliers de microbiologie. La résistance aux antibiotiques et surtout l'implication des biofilms bactériens dans la majorité des situations infectieuses rendent les décisions thérapeutiques aléatoires. De nouvelles technologies faciles d'application, rapides et automatisables doivent voir le jour. Idéalement, les qualités requises pour un nouveau test de sensibilité de bactéries sessiles aux antibiotiques sont d'être reproductible, facile d'utilisation, applicable à de nombreux micro- organismes, prédictif de l'issue clinique, peu coûteux, de couvrir une gamme étendue de concentrations en antimicrobiens, d'éviter les contaminations et de permettre l'obtention rapide des premiers résultats. L'Antibiofilmogramme, protocole adapté du BRT permettant la détermination de la cinétique d'adhésion d'une culture bactérienne supplémentée de diverses concentrations d'antibiotiques, paraît pouvoir répondre en de nombreux points à ces prérequis. Comme déjà justifié précédemment,le BRT semble se positionner idéalement comme le nouvel outil de test de la sensibilité des micro-organismes sessiles aux antibiotiques. Il a permis, par la réalisation de tests Antibiofilmogrammes sur des

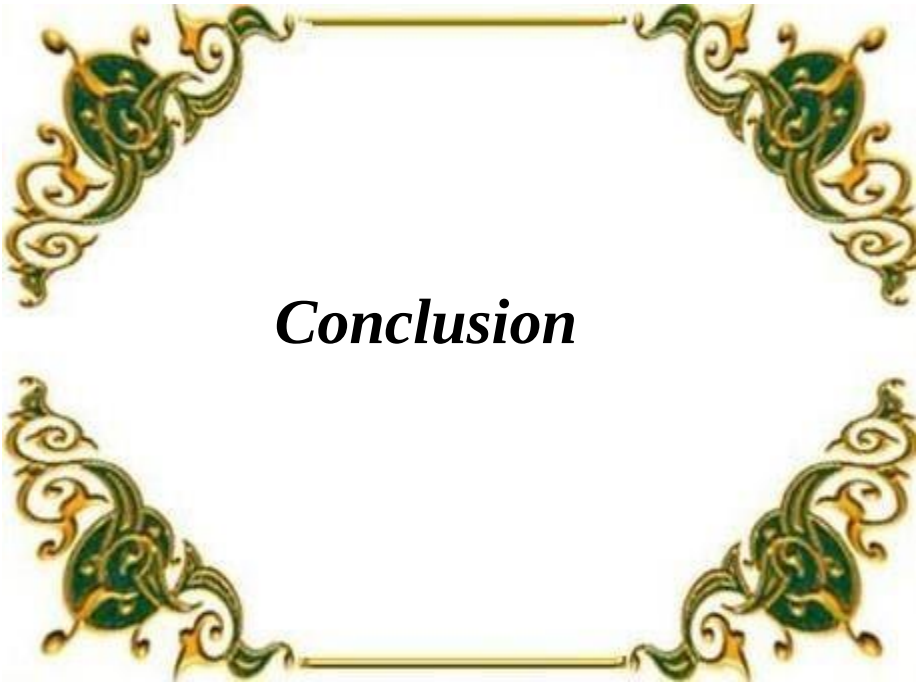
isolats cliniques de *P. aeruginosa*, l'identification directe des effets bénéfiques et délétères des antibiotiques pouvant être préconisés dans le traitement des atteintes pulmonaires des patients mucoviscidosiques. Dans un premier temps, ils ont pu mettre en évidence l'impact préventif des aminosides sur la formation de biofilms par des cellules sessiles. L'addition de concentrations d'antibiotiques, jugées comme pertinentes pour leur efficacité in vivo, à des cultures de *P. aeruginosa*, a conduit à un retardement de l'adhésion spontanée des cellules. Les résultats confirment donc l'intérêt potentiel d'utiliser, comme molécules de premier choix, cette classe d'antimicrobiens pour l'éradication des infections précoces aux bacilles pyocyaniques. Bien entendu, cet effet bénéfique des aminosides ne peut être extrapolé à l'ensemble des souches bactériennes. Il s'oppose même partiellement à certains travaux de la littérature décrivant ces antibiotiques comme n'ayant aucun impact sur l'adhésion précoce des bactéries voire même comme pouvant l'induire à de faibles concentrations **(Hoffman, 2005).(Elliott et al.)** ont également noté cette capacité des concentrations subinhibitrices de tobramycine à déclencher l'initiation de la formation de biofilm par 81 isolats cliniques de *P. aeruginosa*, prélevés chez des patients mucoviscidosiques de moins de 15 ans **(Elliott et al., 2010).** L'âge des patients, chez qui les souches sont isolées, pourrait être un paramètre influençant la réponse des bactéries aux aminosides.

En effet, les souches colonisant des pré-adolescents reflètent encore probablement la primo-colonisation des voies aériennes. Elles expriment donc un phénotype planctonique, permettant ainsi l'induction du mode de vie sessile. À l'inverse, les souches cliniques de collection, chez qui l'inhibition de l'adhésion par les aminosides a pu être mise en évidence, ont toutes été isolées chez des patients mucoviscidosiques de plus de 25 ans (données ne figurant pas dans le RDC). Leur prélèvement a donc été réalisé dans un contexte d'infection chronique, impliquant un taux basal élevé de formation de biofilm. Un potentiel effet inducteur des antibiotiques sera donc difficilement visible, contrairement à un processus de prévention de l'adhésion bactérienne. Finalement, ce phénomène d'induction est justifié comme une réponse adaptative des micro-organismes à une exposition d'antibiotiques. En effet, la *tobramycine* est une molécule initialement synthétisée par la bactérie *Streptomyces tenebrarius,* qui cohabite dans le sol avec *P. aeruginosa.* Il est donc probable que le bacille pyocyanique ait développé une capacité d'adaptation à la *tobramycine* par la formation d'un biofilm résistant, avant l'utilisation même de la molécule en clinique. Le caractère sessile de *P. aeruginosa* répondant de manière biphasique à l'action des antimicrobiens, ces derniers peuvent alors avoir une action agoniste ou antagoniste sur la capacité des bactéries à former un biofilm, en fonction de leurs concentrations **(Kaplan, 2011).** Ce constat souligne alors

l'importance de mener des investigations à des concentrations variées d'antibiotiques. La mise en place d'Antibiofilmogrammes précis et complets semble ainsi conforter le choix d'une proposition thérapeutique efficace pour certains prélèvements cliniques. D'autant plus que cet effet inhibiteur potentiel des antibiotiques sur la formation du biofilm bactérien a pu être confirmé par différentes méthodologies, dont la technique conventionnelle in vitro de marquage des cellules adhérentes au Cristal Violet et un modèle plus complexe de co-culture cellulaire, renforçant ainsi la véracité de son existence. En parallèle, la réalisation d'Antibiofilmogrammes a révélé la capacité des β-lactamines à induire, ou tout du moins accélérer, l'adhésion précoce de souches cliniques non adhérentes (conservation spontanée du phénotype planctonique sur au moins 6h d'incubation). Selon leurs concentrations, ces antibiotiques peuvent conduire à la stimulation négative des micro-organismes, conduisant à l'initiation de la formation d'un biofilm bactérien. Bien que souche-dépendant, cet effet indésirable de l'antibiothérapie générale peut se produire lors du traitement d'infections pulmonaires par *P. aeruginosa*. Comme pour la validation du phénomène d'inhibition par les aminosides, ils ont souhaité confirmer le processus d'induction par une méthodologie in vitro comparative. Ils ont donc eu recours encore une fois à la technique de détection du biofilm par CV. Étrangement, pour cet effet spécifique et délétère des β-lactamines, aucune concordance de résultats n'a pu être retrouvée, alors que l'impact préventif des aminosides avait pu être démontré par les deux méthodes. Cette absence de corrélation entre le BRT et le CV dans le cas présent interrogé sur la limite de détection de la technique de marquage. En effet, un des désavantages bien connus de cette méthode est l'estimation de l'adhésion bactérienne pouvant être biaisée en cas de faible production de biofilms. Sachant que le BRT permet précisément de mettre en évidence l'adhésion précoce des micro-organismes, le phénomène d'induction de la formation précoce de biofilm par les antibiotiques pouvait être détecté en Antibiofilmogrammes et non pas par la méthodologie du CV (temps d'incubation trop court pour permettre un marquage efficace des cellules adhérentes).

Pour vérifier cela, un traitement enzymatique préalable de culture microbienne additionnée de différentes concentrations d'antibiotiques. L'ajoute de DNase I aux préparations bactériennes a permis de confirmer l'inhibition de l'adhésion précoce des bactéries initialement induite par les antibiotiques. Ces données complémentaires, indétectables par les techniques d'étude standards actuelles, précisent un peu plus l'efficacité du BRT et de l'Antibiofilmogramme quant à leur capacité à mettre en avant des comportements bactériens précoces et l'effet consécutif des antimicrobiens sur les micro-organismes. De plus, l'évaluation des cinétiques d'adhésion des isolats bactériens, ayant acquis un phénotype

sessile suite à leur contact avec des concentrations inductrices d'antibiotiques, a révélé le caractère réversible du processus. Concrètement, les β-lactamines sont capables, de par leur simple présence dans le milieu, d'induire l'expression transitoire de gènes spécifiques à l'adoption du phénotype sessile par les bactéries **(Kaplan et al, 2012).** Une fois que les antibiotiques sont retirés du milieu, les micro-organismes, pour qui l'établissement d'un biofilm protecteur engendre une dépense énergétique conséquente, ré-adoptent rapidement leur phénotype planctonique spontané. Ce comportement d'anticipation des bactéries à une future exposition à un traitement antibiotique est courant in vivo. Cependant, pour les patients mucoviscidosiques, pour qui les antibiothérapies sont la plupart du temps administrées en continu, il est peu probable que la réversibilité de l'adhésion précoce bactérienne induite puisse avoir lieu. La conséquence directe de thérapeutiques inappropriées semble alors l'induction prématurée de la chronicité des atteintes pulmonaires. Cet effet indésirable des antibiotiques sur la mise en place d'un biofilm bactérien ne doit donc pas être pris à la légère et semble alors pertinent à évaluer en routine au même titre que le potentiel inhibiteur d'autres molécules. Dans les deux cas, l'Antibiofilmogramme apparaît comme le test le plus adéquat dans l'objectif d'affiner les prescriptions thérapeutiques pour la mucoviscidose.



Conclusion

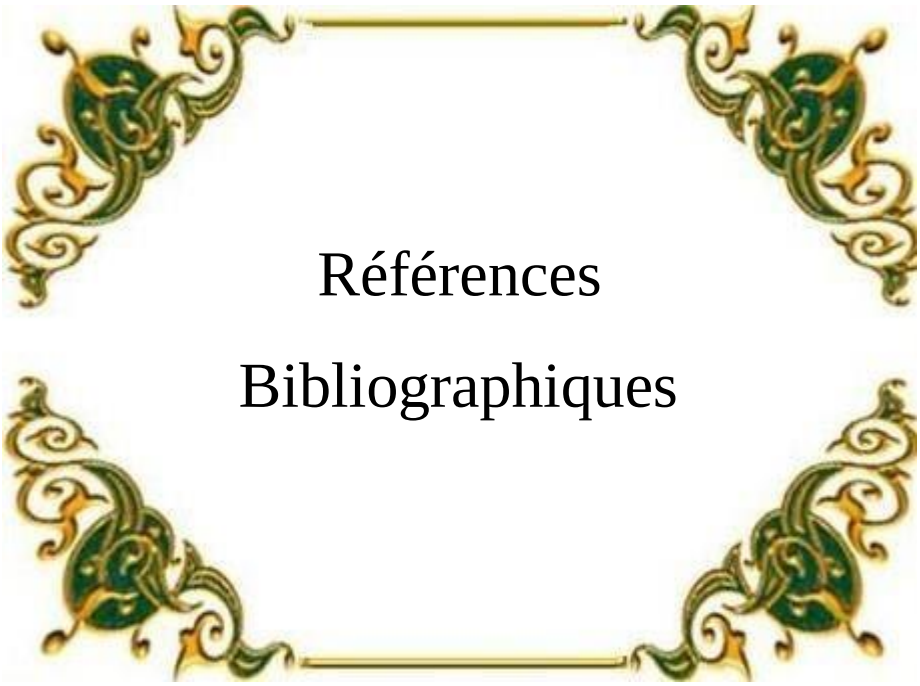
Conclusion

Le biofilm semble faciliter la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement et chez leurs hôtes. Parce que les bactéries formant des biofilms ont des caractéristiques différentes des bactéries planctoniques, Les principales caractéristiques du biofilms sont rappelées et les techniques d'études sont présentées. Elles ont permis d'établir un modèle du développement des biofilms en cinq étapes : adhésion réversible des bactéries de la phase planctonique à une surface, irréversibilité de l'adhésion correspondant à la synthèse de structures à la surface des bactéries, formation de microcolonies, puis développement de ces microcolonies traduisant le stade de maturation du biofilm et colonisation de nouvelles surfaces. Les coopérations métaboliques entre cellules et les échanges d'informations sont évoquées, de nouveaux outils et de nouvelles approches pour la prévention, le traitement et le diagnostic de ces bactéries pathogènes sont requis.. La formation d'un biofilm peut augmenter la résistance aux antibiotiques. La tolérance du biofilm aux agressions extérieures que peuvent constituer les antibiothérapies est une de ses particularités les plus remarquables. En effet, il est désormais largement reconnu que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'antibiotiques, efficaces sur des bactéries sessiles, sont 10 à1000 fois plus concentrées que celles qui le seraient sur leur version planctonique.

La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, nous assistons à une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif.La résistance aux ATBs peut être naturelle ou acquise, Il existe deux mécanismes de résistance aux antibiotiques: Mécanisme génétique et Mécanisme biochimique.

Pseudomonas aeruginosa est donc fréquemment impliqué dans les infections associées aux soins, principalement chez les patients immunodéprimés bénéficiant de dispositifs implantables. La bactérie s'est ainsi imposée au cours des dernières décennies comme le pathogène-type des infections hospitalières et nosocomiales. Elle se rencontre également en ambulatoire chez les patients atteints de mucoviscidos, La résistance de *P. aeruginosa*, aux fluoroquinolones et aux aminosides est devenue préoccupante en milieu hospitalier.

La consommation d'antibiotiques doit être réduite avec Surveillance de la consommation d'antibiotique et de la résistance bactérienne afin de lutter contre l'antibio- résistance.



Références Bibliographiques

A

***Alexander Fleming** est un médecin, biologiste et pharmacologue britannique né le 6 août 1881 à Darvel,Ayrshire en Écosse et mort le 11 mars 1955 à Londre.

***Anonyme 3**. http://www.search.com/reference/Electroporation.html. Site visité le20/02/2012

***Ambler, R.P. (1980)** The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289: 321-31.

***Andriole, V.T. (2000)** The Quinolones. Elsevier Science p517.

***Andriole, V.T. (2005)** The quinolones: past, present, and future. Clin Infect Dis 41: 113-9

***Ahmadi K., Hashemian A. M., Bolvardi E., Hosseini P. K. (2016).**Vancomycin-Resistant PseudomonasaeroginosaintheCasesofTrauma.MedicalArchives.70(1):57–60

***Abd El Galil K., Abd el Ghani S. M., Mohamed A. S., Wael E. N. (2013).** Detection of biofilm Genes among clinical isolates of pseudomonas aeruginosa recovered from some egyptian hospitals.Egyptian Journal of Microbiolo

***A. Philippon (Faculté de Médecine René Descartes, Université PARIS V)**.: résistance bactérienne [Internet]. 2010. Disponible sur: http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio3.htmlgy.36:86-101.

***ANSM. (Juin 2012).** Dix ans d'évolutions de la consommation des antibiotiques en France. [En ligne]. Disponible sur http://ansm.sante.fr/var/ansm_ site /storage/ original/ application/ 80021cd6bb92b94c16a3db89088fd 4f0.pdf (Consulté le 17/04/2014).

***ANSES. (Octobre 2013).** Les résistances aux insecticides, antiparasitaires, antibiotiques...Comprendre où en est la recherche. [En ligne]. Disponible sur https://www.anses.fr/fr/documents/CDLR-mg-Antibioresistance3.pdf (Consulté le01/04/2014).

B

***Ball, P. (2000)** Quinolone generations: natural history or natural selection? J Antimicrob Chemother 46: 17-24.

***Bryan, L.E., and Kwan, S. (1983)** Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother 23: 835-45.

***Bonnet, R. (2006)** B-lactamines et entérobactéries. In: Courvalin, P., Leclerck, R., Bingen, E. Antibiogramme. Paris. ESKA : 2éme édition 15: 141-62.

***(Bakalar N. Penicillin, 1940)**. The New York Times [Internet]. 23 févr 2009 ; Disponiblesur: http://www.nytimes.com/2009/02/24/health/24firs.html79

***Bouchakour Souad, Hammouchi Meryem.** Analyse des prescriptions d'antibiotiques

enambulatoire chez l'enfant et du rôle du pharmacien d'officine dans leur bon usage [Mémoire]. [Tizi Ouzou]: Université Mouloud Mammeri; 2016.

***Bactériologie médicale**: techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2011. 611 p.

***Belhadj Asmaa, Belboula Hind**. Antibioprophylaxie Chirurgicale cas du CHUO[Mémoire]. [Oran]: Université d'Oran1; 2015

***Beloin C, Ghigo JM (2005)**Findinggene-expression patterns in bacterial biofilms. Trends Microbiol., 13,16-19

***Beloin C,Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminskim, Balestrino D, Haagensen JA, Molin S, Prensierg , Abeilleb B, Ghigo JM (2004)** Global impact of mature biofilm life style on Escherichia coli K 12 gene expression.Mol.Microbi

***Burmolle M,WebbJSetal.(2006)** Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms.Appl.Environ.Microbiol.3916-3923]ol.,51,659-674

***Balestrinod , Haagensen JA, Richc, Forestierc(2005)** Characterization of type 2 quorum sensing in Klebsiella pneumoniae and relationship with biofilm formation .J. Bacteriol. ,187 ,2870 -2880.

***BallowC.H., Schentag J. J. (1992).**Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance:Report of the National Nosocomial Resistance Surveillance Group.Diagnostic Microbiology And Infectious Disease.15:37-42.

***Bjorklofk, Nurmiaholasilael, Klingern, Haahtelak, Roantschukm. (2000)** Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated Pseudomonas syringaeon the leaf surface.J.Appl.Microbiol.,89,423-432

***Beloinc, Dares, Ghi JM (2005)** Colonization of abiotic surfaces.In: CURTISSIIIR, BÖCKA,INGRAHAMJL,KAPERJB,NEIDHARDTFC,RILEYM,SQUIRESCL,editorEscheri chiacoliand Salmonella .Cellular and Molecular Biology. Washington, D.C.: ASMP ress, chapter8.3 .1.3.

***Brooun A, Liu S, Lewis K.** Adose-response study of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms.Antimicrob Agents Chemothe r2000;44:640–6. [Google Scholar] Ballow C. H., Schentag J. J. (1992).Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance: report of the National Nosocomial Resistance Surveillance Group.Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.15:37-42

***BMR-Raisin. (2011).** Surveillance des bactéries multi-résistantes dans les établissements de santé en France. [En ligne]. Disponible sur

http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8853 (Consulté le 06/06/2014)

***Bryskier, A. (1999)** Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris Ellipsesp55

C

***Cattoir, V. (2012)** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. Rev Francoph Lab 445: 79-87.

***Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004)** Bêtalactamines. EMC-Mal Infect 1: 129–202

***Chast F.** Le suivi thérapeutique des médicaments anti-infectieux. Rev Fr Lab. 2004;2004(365):21–26

***Chow J. W., Fine M. J., Shlaes D. M. (1991).**Enterobacter bacteremia:clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy.Annals of Internal Medicine.115:585-90

***Chulyon.** 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. [En ligne]. Disponible sur http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/Ministere_Sante/1999_100_recommandations_ministere.pdf (Consulté le 12/06/2014)

***CCLIN-ARLIN. (2013).** Surveillance et signalement des infections nosocomiales et associées aux soins dans le cadre du RAISIN. [En ligne]. Disponible sur http://www.cclin-arlin.fr/RAISIN.html (Consulté le 03/06/2014)

***Calgagno F., Lacroix R. (2011).** Pharma-memo Infectiologie. Paris, France : Editions Vernazobres- Greco. 246 p.

***Chaussade H, Sunder S, Bernard L, Coloby P, Guy L, Karsenty G, et al**. Les médicaments antibiotiques en urologie. Prog En Urol. nov 2013;23(15):1327-41.

.***Cerca, N**.,etal.,Effects of growth in the presence of sub inhibitory concentrations of Dicloxacillin on Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus biofilms. ApplEnvironMicrobiol, 2005.71(12):p.8677-82.

***Costertonjw,Stewartps,Greenbergep(1999**)Bacterial biofilms: acommon cause of persistent infections.Science,284,1318-1322.

***Costertonjw, Lewandowskiz, Debeerd, Caldwelld, Korberd, James G (1994)** Biofilms, the customized microniche .J. Bacteriol. 176,2137_2142

***Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., &Bernardi, T. (2007).** Anewdevice For rapide valuation of biofilm formation potential by bacteria. Journal of Microbiological Methods,68(3),605–612.https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010

***Charles G. Roberts M. S. (2013).** The role of biofilms inreprocessing medical devices. American Journal of Infection Control.41(5):77-80

***Courvalin P. (2008).** La résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons deMécanismes biochimiques et génétiques. Bulletin de l'Académie Vétérinaire. De France 161p.

***CourvalinP.,(2006).**Vancomycin resistance in gram-positive cocci.Clinical InfectiousDiseases.42(1):S25-34.

***Camps M.(2011).**Bio-essaisanti-adhésion sur des bactéries marines pour lecriblage deMolécules et de revêtement santi fouling.Thèse deDoctorat en biologie marine. Université de Toulon, Toulon.42p.

***Crémet L., Corvec S., Batard E., Auger M., Lopez I., Pagniez F., Dauvergne S.,Caroff N.(2013).**Comparison of thre emethods to study biofilm for mation by clinical strains of Escherichia coli.Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.75(3):252-5

Casfm, Comitede l'antibiogramme de la societe française de microbiologie (2020). Recommandation.p:12-15,27,46-48

***Cavallo J. D., RamisseF., Girardet M., Vaissaire J., Mock M., Hernandez E. (2002**). Antibiotic Susceptibilities of 96 isolates of Bacillus anthracis isolated in France between 1994 and 2000.Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46:2307-2309.

D

***Drlica, K., and Zhao, X. (1997)** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev 61: 377-92.

***Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008)** Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrob Agents Chemother 52: 385-92.

***Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., and Falagas, M.E. (2009)** Do we still need the aminoglycosides? Int J Antimicrob Agents 33: 201-205.

***Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007)** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis 45: 88-94.

***Dr Najoua Bouzgarou-Besbes, Dr Mohamed Hechmi BESBES**. Règles De PrescriptionD'un Traitement Antibiotique

***D. Mohammedi**. Classification et mode d'action des antibiotiques [Internet]. 2012.Disponible sur: http://www.sante.dz/aarn/classification.pdf Définition et Histoire des Antibiotiques [Internet]. Les Antibiotiques. Disponible sur: http://www.antibiotique.eu/deacutefinition--histoire.html

***Da Re S. et Ploy MC. (Février 2012).** Antibiotiques et réponses SOS bactérienne, une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. Médecine/Sciences. 28(2). 179-184.

***Donlanrm, COSTERTONJW (2002**) Biofilms: sur vival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin.Microbiol.Rev.,15,167-193

***Davies, D.,** Understandingbiofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov2(2):, 2003 p.114-22

***Degremon. (1998).** Mémen to technique de l'eau.Degremont,Paris.592.

***De Almeida Silva K. C. F., Calomino M. A**., DeutschG. ,De Castilho S. R., De Paula G.R., Espe RL. M. R., Teixeira

E

***Eureka Santé par Vidal**. Les familles d'antibiotique [en ligne]. Consulté le 6 mars 2018. Disponible sur : https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/familles.html.Effet Bactéricide concentration-dépendant, temps-dépendant - Recherche Google [Internet]. Disponible sur: https://www.google.fr/search

***ECDC. (Novembre 2012).** Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union, ESAC-Net. [En ligne] Disponible sur http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/ESAC-Net- summary- antibiotic consumption.pdf (Consulté le 04/06/2014)

F

***Forge, A., and Schacht, J. (2000)** Aminoglycoside antibiotics. Audiol Neurootol 5: 3-22.

***Flemming H-C, Wingender J**. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol.2010;8:623–633.[Pub Med][Google Scholar].

***FillouxA,MichelG,BallyM.GSP-** dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the X cpsystem of Pseudomonas aeruginosa. Microbiol Rev1998;22:177–98.[Google Schola

***Fishbain J., Anton Y. P.(2010).**Treatment of Acine to bacter Infections. Clinical Infectious Diseases.79-84.

***Floret N., Bertrand X., Thouverez M., Talon D.(2009).**Infections nosocomiales à Pseudomonas aeruginosa: origine exogène ou endogène de la bactérie responsable. Pathologie Biologie.57:9-12.

***Florence B. J. (2014).**Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de Bactéries marines.Thèse dedoctorat en Microbiologie/Biochimie.UniversitédeToulon, Toulon.76p.

***FreneyJ., Reanaud F.,Hansen W., Bollet C. (2000).** Précisde bactériologie clinique.ESKA, Paris.p:557-611

J

***Jana, S., and Deb, J.K. (2006)** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl Microbiol Biotechnol 70: 140-50.

***Jean-luc Aboya MOROH**. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de morinda morindoides [Thése]. [Bretagne]: université de Bretagne occidentale;2013.

***Jyoti T., ShrayaneeD., Zeeshan F., Saif H. (2014).** Multi drug Resistance: AnEmerging Crisis.Interdisciplinary Perspective son Infectious Diseases.7p

***Jailto L. D. C. L., Lilian R. A., Paula R. L., JoãoP. B. N., Maria A.V. M., Marcia** M.C.M (2018).Biofilm production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and structural Changes in Las R protein of isolates non biofilm-producing. Infectious diseases.22(2): 129–136

H

***Hooper, D.C., and Rubinstein, E. (2003)** Quinolone antimicrobial agents. Americ Soc Microbiol p: 485

***Hooper, D.C. (2001)** Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis7: 337–41.

***Henri Ciat (1933)**Studies offre shwater bacteria.Adirect microscopic technique. J. Bacteriol.,25,277-287

***Humberb, Riedelk, Hentzerm, Heydorn A, Gotschlich A,Givskovm, Molin S Eberll(2001)**The cepquorum-sensingsystem of Burkholde riacepaciaH111controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology.147,2517-252.

***Hoffman, L. R., etal**., Aminoglycoside antibioticsin duce bacterial biofilmformation.Nature, 2005.436(7054):p.1171-5

***Hota S., Hirji Z., Stockton K., Lemieux C., Dedier H., Wolfaardt G., Gardam M. A.(2009).** Out break of multi drug-resistant Pseudomonas aeruginosa colonization and infection Secondary to imperfectin tensive care unit room design.Infection Control and Hospital Epidemiology.30:25-33.

***Hola,V.; Ruzicka, F. (2011).** The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters.In: Urinary Tract Infections.Thèse dedoctorat.Masaryk University,Brno Czech Republic.p: 322,249-289

I

***INSERM. (Mai 2013).** Dossiers d'informations. [En ligne]. Disponible sur http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/antibiotiques (Consulté le 31/03/2014)

***IPP, Institut pasteur production.(1981).** Milieuxet réactifs de laboratoires Pasteur.Paris.p: 589.

G

***Ghouli A, Senoussi A**. Activité biologique des diazépines synthétisés du phosphore florique [Internet] [mémoire]. Universite Kasdi Merbah Ouargla; 2015 Disponible sur: http://bu.univ-ouargla.dz/master/pdf/GHOULI_SENOUSSI.pdF

Guillot JF. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques [Internet].1989. Disponible sur: https://hal.archivesouvertes.fr/file/index/docid/901839/filename/hal-00901839.pdf

***Gaudel Pauline. (2013).** Juste usage des antibiotiques à l'hôpital de Brabois Adultes CHU de Nancy : Bilan du rôle du pharmacien et de l'équipe opérationnelle en infectiologie de 2006 à 2012. [Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie]. Université de Lorraine.

***Ghigo JM (2001)** Natural conjugative plasmids in duce bacterial biofilm development. Nature.412,442-445

***Genevau XP, Mulle RS, Baud AP. (1996)**Arapid screening procedureto identify mini T n 10 insertionmutants of Escherichia coliK-12 with altered adhesion properties. FEMS Microbiol. Lett.,142,27-30

***Gilbert, P., etal.,** The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities .Adv Microb Physiol,2002.46:p.202-56.268.

***Guirau dJ. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. p:185-265

***Ghane M., Azimi Z. (2014).** Isolation,Identification and Antimicrobial Susceptibility of Pseudomonas spp Isolated from Hospital Environmentin Tonekabon, NorthofIran. Applied and Environmental Microbiology.2(4):97-101

***GillelandL.B., Gillel and H.E., Gibson J.A., Champlin F.R. (1989).**Adaptive resistance to Aminoglycoside antibioticsin Pseudomonas aeruginosa. Medical Microbiology.29:41–50.

***Guillemot D., Carbon C., Balkau B., Geslin P., Lecoeur H., Vauzelle-Kervroëdan F., Bouvenot G.,EschwégeE.(1998).** Low Dosage and Long Treatment Duration of β-Lactam:Risk Factors for Carriage of Penicillin Resistant Streptococcus pneumoniae. The American Medical Association.279(5):365-70.

***Goossens H., Ferech M., Stichele R.V., Elseviers M.(2005).**Outpatient antibioticusein European dassociation with resistance : across-national data base study. The Lancet. 365(9459) :579-87.

K

***Kotra, L.P., Haddad, J., and Mobashery, S. (2000)** Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob Agents Chemother 44: 3249-56.

***Kattan, J.N., Villegas, M.V., and Quinn, J.P. (2008)** New developments in carbapenems. Clin Microbiol Infect 14: 1102-11.

***KONE MNS**. Etude de la consommation des antibiotiques, antipaludiques et desanalgésiques non morphiniques dans l'unité des urgences du service de pédiatrie duCHU Gabriel TOURE [Internet] [Thése de médecine]. Université de BAMAKO ; 2009.Disponible sur : http ://www.keneya.net/fmpos/theses/2009/med/pdf/09M396.pdf

***Karthikeyan K Kumarasamy et al. (Septembre 2010).**Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan and the UK : a molecular, biological, and epidemiological study. 10(9). 597-602

***Kumarasamy Karthikeyan, M. A. Thirunarayan,Padma Krishnan. (21 juillet 2010).** Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1and armA in clinical isolates ofAcinetobacter baumannii from India. J Antimicrob Chemother 2010.65. 2253–2254

***Kelly,B.G.,A.**Vespermann, and D.J.Bolton, Horizontal gene transfer of Virulence determinants in selected bacterial food borne pathogens.Food Chem Toxicol,2009. 47(5):p.969-77

***Khourya E, Lam K, Ellis B, Costerton JW.(1992**) Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. Asaio J.,38,M174-178.Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol BiolRev.2009;73:310–347. [ArticlePMC gratuit][PubMed][GoogleScholar]

***Karatuna O., Yagci A. (2010).** Analys is of quorum sensing-dependent virulence factor production and itsrelation ship with anti microbial susceptibilityin Pseudomonas aeruginosa respiratory isolates .Clinical Microbiology and Infection.16:1770–5

L

***Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998)** DNA gyrase and topoisomerase IV : biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochim Biophys Acta 1400 : 29-43.

***Lesher, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., and Brundage, R.P. (1962)** 1,8-

Naphthyridine Derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J Med Pharm Chem91: 1063-65.

***Lambert, T. (1997)** Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. Réan Urg 6 : 9-16.

***Livermore, D.M. (1995)** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 8: 557-84.

***Lozniewski A., Rabaud C., Nancy**.résistance bactérienne aux antibiotiques. C clin Sud - Est; 2010.

***Lawrencejr, Korber DR, Hoyleb D, Costerton JW, Cal well DE(1991)** Optical sectioning of microbial biofilms. J. Bacteriol., 173,6558-6567. LEWISK(2005) Persister cells and ther iddle of biofilm survival.Biochemistry (Mosc),70,267-274

***Luppens, S. B., etal.,**Effect of Veillonel laparvula on the antimicrobial resistance and gene Expression of Streptococcus mutans grown in a dual species biofilm.Oral Microbiol Immunol, 2008.23(3):p.183-9

***Larpent J. (1997).** Microbiologie de seaux d'alimentaire: Technique de labo. Tecet Doc. p:294-300

***Lashéras A., Guisset O., Boulestreau H.,Rogues A. M., Fiore M., Szajner S., Bezian M.C., Gabinski C., Gachie J. P. (2006**).Réservoir settransmission de Pseudomonas aeruginosa en Réanimation médicale.Médecineet maladie sinfectieuses.36:99-104

***Lazdunski A. (2003).** Pseudomonas aeruginosa: modèle de choix pour l'étude d'une Bactérie pathogène opportuniste. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation .22: 523-526

***L. A. (2017).** Molecular characterization of multi drug-resistant (MDR) Pseudomonas Aeruginosa isolated inaburn center. Burns.43:137–143.

***Landman D., Bratu S., Alam M., Quale J.(2005).** City wide emergence of Pseudomonas Aeruginosa strains with reduced susceptibility to polymyxin B.Antimicrobial Chemotherapy. 55:954-957

***Liuc., Bayer A., Cosgrove S. E., Daum R. S., Fridkins. K., Gorwitzr. J., Kaplan S. L., Karchmer A.W., Levined. P., Murray B. E., Rybak M. J., Talan D. A., Chambers H. F. (2011).** Clinical. Practice Guide lines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in Adultsand Children. Infectious Diseases Society of America.52:1–38.

***Leekha S., Terrell C. L., Edson R. S. (2011).** General Principles of Antimicrobial Therapy. MayoClinic Proceedings.86(2):156–167.

***Lattab A. (2018).** Effet des composésnaturelssurl'adhérenceetlaformationdebiofilm à Pseudomonas aeruginosa. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. 69p.

***Le fonctionnement de la résistance aux antibiotiques** [Internet]. Les Antibiotiques. Disponible sur : http://www.antibiotique.eu/le-fonctionnement-de-la-reacutesistance.html.

M

***Magnet, S., and Blanchard, J.S. (2005)** "Molecular insights into aminoglycoside actionand resistance." Chem Rev 105: 477-98.

***Mevius, D.J., Rutter, J.M, Hart, C.A., Imberechts, H., Kempf, G., Lafont, J.P., Luthman, J., Moreno, M.A, Pantosti, A., Pohl, P., Willadsen, C.M., (1999).** Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, Editions Le point vétérinaire. p 1-57

***Mcdermott W, Rogers DE**. Social ramifications of control of microbial disease. Johns Hopkins Med J 1982;151(6):302–12 Mécanisme génétique de résistance des bactéries - Recherche Google [Internet]. Disponible sur: https://www.google.fr/search

***Morghad Touhami.** Surveillance et connaissance des attitudes et comportements des médecins et autres sur l'usage des antibiotiques et leur résistance [mémoire]. [Tlemcen]:Université Aboubekr Belkaïd; 2013

***Mai Huong Ly-Chatain. (18 février 2014).** The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. Frontiers in Microbiology. 5 (article 51). [En ligne]. Doi 10.3389/fmicb.2014.00051

***Ministère des Affaires sociales et de la Santé. (mars 2009).** Les infections nosocomiales : recommandations aux établissements de soins. [En ligne]. Disponible sur http://sante.gouv.fr/les- infections-nosocomiales-recommandations-aux-etablissements-de-soins.html (Consulté le 11/06/2014)

***Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé. (2011).** Plan national d'alerte sur les antibiotiques2011-2016.Disponiblesur http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_antibiotiques_2011-2016_DEFINITIF.pdf (Consultéle 16/05/2014)

***Morelière M.** Étude de la prescription d'antibiotiques par les médecins généralistes français dans les angines, les bronchites aiguës, les états fébriles et les rhino-pharyngites, de 2000 à 2009. [Internet] [Thése de médecine].université de versailles saint-quentin- en-yvelines ufr des sciences de la sante paris ile de France ouest; 2014.disponible sur: http://www.sfmg.org/data/generateur/generateur_fiche/943/fichier_these_marie_morelie

re33346.pdf

***Meradj S. (2017).** Pseudomonas aeruginosa: Facteurs devirulence et évaluation de la Résistance aux bêtalactamines et aux quinolones.Thèse de doctorat.Université Badji Mokhtar, Annaba.p:10-28.

***Milindd., amdevs., Ashap., Basavrajn. (2014).** Pseudomonasaeruginosafrom hospital environment.MicrobiologyandInfectiousDiseases. 4(1):42-43

***Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel D. M., VanEldere J., Glupczynski Y., Laethem Y.V., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P. M., Bambeke F.V. (2007).** Pseudomonas aeruginosa: resistance and the rapeutic options at the turn of the new millennium. Clinical MicrobiologyandInfection.13(6):560-78

***Meyer k. S., Urbanc., Eaganj. A. (1993).** Nosocomial out break of Klebsiella infection resistant to late generation cephalosporins. AnnalsofInternalMedicine.119 :353-8

N

***Nguyen, J.C., and Lambert, T. (2012)** Interpretative analysis of aminoglycoside resistance by the antibiogram. Rev Francoph Lab 445: 75-77.

***Nordmann, P., and Carrer, A. (2010)** Carbapenemases in enterobacteriaceae. Arch Pediatr 17:154-62.

***Nauciel C, Vildé J-L**. Bactériologie médicale, connaissance et pratique. 2 éme édition. Paris : Masson ; 2005. 273 p

***Nordmann P. (26 novembre 2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. MEDECINE / SCIENCES. 26 (11).950-959

***Nagant C., Tré-Hardy M., Devleeschouwer M., Dehaye J. P. (2010**). Study of the initial phase Of biofilm formation using a biofomic approach. Journal of Microbiological Methods. 82:243-248

***Nyaledome A. I. (2016).** Pseudomonas aeruginosa: Epidemiologie et état actuel des Resistance à l'hopital militaire d'instruction mohammed v.Thèse de doctoraten Pharmacie. Universite mohammed V, Rabat. p:30-31

O

***Oxoby, M., (2002)** Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques. P 3-12.

***OMS. (2014).** Rapport mondial de l'OMS sur la résistance aux antimicrobiens.En ligne]. Disponible sur http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/ (Consulté le 04/05/2014)

***Odenholt, I.,** Pharmaco dynamic effects of sub inhibitory antibioticc on centrations .IntJ Antimicrob Agents, 2001. 17(1):p.1-8

***O'toole GA, Kolter R (1998**) Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Mol.Microbiol., 30,295-304.

***Olivares Elodie**, Badel-Berchoux Stéphanie, Provot Christian,Jaul hac Benoît,Prévost Gilles,BernardiThierry,JehlFrançois. https://tel.archives-ouvertes.fr

O'Toole, George A. (2011). Micro tite rDish Biofilm Formation Assay.Journal of Visualized Experiments,(47).https://doi.org/10.3791/2437

***Oliveira A. C., Damasceno Q. S. (2010**). Surfaces of the hospital environmentas possible Deposits of resistant bacteria: areview.TheUniversity of SãoPaulo Nursing School Journal. 44)4:(1112-7.

***Otter J. A., Yezli S., French G. L. (2011).** Ther oleplayed by contaminated surfaces in the Transmission of nosocomial pathogens.Infection Control and Hospital Epidemiology.32(7): 687-699.

***Otter J. A., Yezli S., Salkeld J. A. G., French G. L. (2013).** Evidence that contaminated surfaces Contribute to the transmission of hospital pathogens and anoverview of strategiesto Address contaminated surfaces inhospital settings. American Journal of Infection Control. 41(5):6–11

P

***Philippon, A. (2008)** Entérobactéries des bêtalactamines. Elsevier Masson SAS, Paris, Biologie clinique 90-05-0145 : 1-18.

***Ploy Marie-Cécile. (2012)** Résistance aux antibiotiques. [Présentation PowerPoint]. Cours de DFGSM3. Faculté de médecine de Limoges

***Parlement du Canada. (2008).** La résistance aux antibiotiques. [En ligne]. Dispo0nible sur http ://www.parl.gc.ca/content/lop/researchpublications/prb9910-f.pdf (Consulté le 20/04/2014)

***Pour la science. (2013).** Un nouveau mécanisme de résistance des bactéries [En ligne]. Disponible sur http://www.pourlascience.fr/ewb_pages/a/actu-un-nouveau-mecanisme-de-resistance-des-bacteries-30948.php (Consulté le 02/05/2014)

***Prescott M., Harley P., Klein A. (1999).** Microbiologie. De Boeck Université. 981p Pantanellaf..ValentiP., NataliziT., PasseriD., BerluttiF. (2013). Analyticaltechniquesto study microbial biofilm on abiotic surfaces: prosand consof the main techniques currently inuse. AnnalidiIgiene. 25:31-42

***Pantanella F., Valenti P., Natalizi T., Passeri D., Berlutti F. (2013).** Analytical

techniquesto study microbial biofilm on abiotic surfaces: prosandcons of the maintechniques currently inuse.AnnalidiIgiene.25:31-4

***Poole k**. Multidrug effluxpumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas Aeruginosa and related organisms. JMolMicrobiol Biotechnol2001;3:255–64. [GoogleSchola

***Perez L. R., Machado A. B., Barth A. L. (2013).** The presence of quorum-sensinggenesin Pseudomonas isolates infecting cystic fibrosisandnon-cysticfibrosispatients.Current Microbiology.66:418–20.

***Perez L. R., Costa M. C., Freitas A. L., BarthA. L. (2011).** Evaluation of biofilm production by Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients.Brazilian Journal of Microbiology.42:476–9

***Pezhman K., Parviz M., Rasool Y. M., Manoochehr K., Mojtaba H. Y., Dara D., Mohammady. A(2019).** Molecular characterization of clinical and environmental Pseudomonas aeruginosa isolated in aburn center.Saudi Journal of Biological Sciences.1731-1736

R

***Ruppé, E. (2010)** Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. Antibiotiques 12: 3-16.

***Rend, Bedzykla, Thomassm, Yerw, Woodtk (2004)** Gen expression in Escherichia coli biofilms. Appl. Microbiol.Biotechnol., 64,515-52

***Reisnera, Haagensenja, Schembrima, Zechnerel, Molins (2003**) Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. Mol.Microbiol., 48,933-946 RahmeL G, Ausubel FM,CaoH,etal. Plants and animal sshare functionally common bacterial virulence factors. ProcNatlAcadSci USA2000 ;97 :8815–21. [Google Schola

***Ramseyer Jérémie.** Guide d'Antibiothérapie Raisonnée des Infections Bactériennes du Chien [Thése]. [LYON] : L'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD ; 2010.

***Roy PH.** Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. 1997; Disponible sur: http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/489

***Rivas L., Dykes G. A., Fegan N. (2007).** Acomparative study of biofilm formation by Shiga Toxigenic Escherichia coli using epifluorescence microscopyon stain less steeland a Micro titre plate method.Microbiological Methods. 69:44-51

***Rayner C., Munckhof W. J. (2005).** Antibiotics currently used in the treatment ofinfections caused by Staphylococcus aureus. Internal Medicine. 35(2):3–16

*****Réa-raisin, **réseau d'alerte d'investigation et de surveillance desinfections nosocomiales (2013). Surveillance desinfections nosocomiales en réanimation adulte.20p**

S

***Soussy, C.J. (2006)** Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In: Courvalin, P., Leclerck,R., and Bingen, E. Antibiogramme. Paris ESKA 2éme édition 21: 261-77.

***Stoodley P., Debeer, D., and Lewandowskiz. (1994)** Liquid Flowin Biofilm Systems.Appl.Environ.Microbiol., 60,2711-2716.

***Sutherlandiw (2001)** The biofilm matrix—animmobilized but dynamic microbial environment.TrendsMicrobiol.,9,222-227

***Schembrima, Khjaergaard k, Klemm P (2003**) Global gene expression in Escherichia coli biofilms.Mol.Microbiol., 48,253-267

***Shapiroja (1998)** Thinking about bacterial population sasmulti cellular organisms.Annu. Rev;Microbiol.528.1-104

***Stewart, P. S.,** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms.IntJMed Microbiol, 2002.292(2):p.107-13

***Simoes, M., L. C.** Simoes, and M.J.Vieira, Species association in creases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments.WaterRes,2009.43(1):p.229-37

***Stapper A. P., Narasimhan G., Ohman D. E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Høiby N., Matheek. (2004).** Alginate productionaffects Pseudomonas aeruginosa biofilm Development and architecture butis not essential for biofilm formation.Medical microbiology.53(7):679-90.

T

***Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., and Arrow, A.S. (1987)** Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. Microbiol Rev 51 : 439-57.

***Tristan Coustès.** loi d'avenir agricole, règlementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance [Thése]. École Nationale Vétérinaire D'alfort; 2016.

***Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., Devleeschouwer M. J. (2008).** Invitroactivityof Antibiotic combinations against Pseudomonas aeruginosa biofilm and planktonic cultures. International Journal of Antimicrobial Agents.31:329–336

***Top, E. M., D**.Springael,and N.Boon,Erratumto »Catabolicmobilegenetic

V

***Vakulenko, S.B., and Mobashery, S. (2003)** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 16: 430-50

***Vivien E.** Biosynthèse de l'albicidine, une molécule antibiotique et une pathotoxine de Xanthomonas albilineans. 2005 .Disponible sur: http://agritrop.cirad.fr/534322

***Vanessa Janin.** Evaluation de l'antibiothérapie au Centre Hospitalier de Neufchâteau(France) et à la

Polyclinique du Sud de Marrakech (Maroc) [Thèse]. [France]: Université Henri Poincare - Nancy 1; 2010.

***Van Bambeke F, Pharm S**. Pharmacologie et Pharmacothérapie anti-infectieuse.Syllabus Natl Belge Pharmacol. 2007;2008:1–134

***Vallet I, Olson JW**, LoryS,LazdunskiA,FillouxA. Thechaperone/usherpathwaysof Pseudomonas aeruginosa:identification of fimbrialgene clusters (cup) and their Involvementin biofilm formation.ProcNatlAcadSciUSA2001;98:6911–6.[GoogleSchola

***Vettoretti L., Floret N .,** Hocquet D.,Dehecq B.,Plesiat P., Talon D.,Bertrand X.(2009). Emergence of extensive drug-resistantPseudomonas aeruginosa in aFrenchuniversity hospital.European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.28(10) : 1217–22.

W

***Wittebole X., De Roock S., Opal SM. (Janvier 2014**). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence. 5 (1). 226-235

***WHO, World Health organization. (2014).** Antimicrobial resistance global reporton *surveillance.12p

Whiteley M , Bangera MG,BumgarnerRE,etal.Gene expression in Pseudomonas aeruginosabiofilms.Nature2001;413:860–4.[GoogleScholar].

***Walld , Kaiser D**.Type IV pili and cell motility.Mol Microbiol1999;32:1–10.[Google Scholar

Y

***Yuichi Wakamoto et al. (Janvier 2013).** Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria, Science. 339 (6115).91-95.

Z

***Zenkouai l ., Azizi R. (2015).** Manuel de prélèvement. INH. 43-44p.

***Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997)** Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in Escherichia coli. Genes Dev11: 2580-92.

Annexes

Annexe1 : Principales classes d'antibiotiques et leurs spectres d'activité **(zomahoum,2005, Ezéby, 2007).**

Familles ou moléculesnon classées (Modes d'action)	**Principales groupes ou molécule**	**Spectre**
Acide fusidique(Inhibition de la synthèse des protéines)	Acide fusidique	Étroit (coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif,)
Aminosides ou aminoglycosides (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Amikacine, Apramycine Dibékacine, Dihydrostreptomycine, Framycétine, Gentamicine, Isépamicine, Kanamycine Néomycine, Nétilmicine, Paromomycine, Sisomicine Spectinomycine, Streptomycine, Tobramycine.	Large (sauf bactéries anaérobies).
Bêta-lactamines (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	**groupe de la pénicilline G** Clométocilline, Pénicilline G Pénicilline V	Étroit (coques et bacilles à Gram positif et à Gram négatif)
	Pénicillines antistaphylococcique Cloxacilline, Dicloxacilline, Méticilline, Nafcilline, Oxacilline	Étroit (identique à pénicilline G).
	aminopénicilline Amoxicilline Ampicilline et molécules libérant de l'ampicilline *in vivo* (bacampicilline, pivampicilline, métampicilline, hétacilline) Epicilline	Large.
	Carboxypénicillines Carbénicilline, Carfécilline Ticarcilline	Large.
	Uréido pénicillines Azlocilline,Mezlocilline Pipéracilline	Large.
	Pénicilline sulfone Sulbactam, Tazobactam.	Inhibiteurs des bêta lactamases.
	Carbapenems Imipenème	Large (grande stabilité vis à vis de diverses bêta-lactamases).
	Clavams ou oxapenam Acide clavulanique	Inhibiteur des bêta lacatamases (utilisé en association avec une autre bêta-lactamine).
	Monobactams Aztréonam.	Étroit (bacilles à Gram négatif aérobies

Bêta-lactamines (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	**Céphalosporines de la 1 ère génération** Céfalexine, Céfaloridine, Céfalotine, Céfapirine Céfazoline	Large.
	Céphalosporines de la 2 ème génération Céfamandole, Céfotétan, Céfoxitine, Céfuroxime, Céfuroxime	Large.
	Céphalosporines de la 3 ème génération Céfopérazone, Céfotaxime Ceftazidime, Ceftizoxime Ceftriaxone, Céfixime, Latamoxef	Large.
	Autres céphalosporines Céfixime, Céfopérazone, Cefsulodine	Large.
Diaminopyrimidines (Inhibition de ladihydrofolate réductase)	Baquiloprim, Triméthoprime	Large.
Fosfomycine (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	Fosfomycine	Large
Glycopeptides (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	Teicoplanine, Vancomycine	Etroit : bactéries à Gram positif.
Imidazolés (Coupure des brins d'ADNet déroulement de l'ADN)	Métronidazole, Ornidazole, Secnidazole, Tinidazole	Étroit (bactéries anaérobies strictes)
Lincosamides (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Clindamycine, Lincomycine	Étroit (essentiellement coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif)
Macrolides (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Azithromycine, Clarithromycine Dirithromycine, Érythromycine, Josamycine, Midécamycine, Miokamycine, Oléandomycine, Roxithromycine, Spiramycine, Tilmicosine, Tylosine.	Étroit (essentiellement coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif)
Nitrofuranes (Inhibition de la synthèsede l'ADN)	Furaltadone, Furazolidone, Nifuroxazide, Nitrofurantoïne Nitrofurazone.	Large.
Novobiocine (Inhibition de la réplication de l'ADN)	Novobiocine.	Étroit (coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif).
Phénicolés (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Chloramphénicol, Florfénicol Thiamphénicol.	Large
Diaminopyrimidines (Inhibition de ladihydrofolate réductase).	Baquiloprim, Triméthoprime	Large.

Fosfomycine (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	Fosfomycine	Large
Glycopeptides (Inhibition de la synthèsedu peptidoglycane)	Teicoplanine, Vancomycine	Etroit : bactéries à Grampositif.
Imidazolés (Coupure des brins d'ADNet déroulement de l'ADN)	Métronidazole, Ornidazole, Secnidazole, Tinidazole	Étroit (bactéries anaérobiesstrictes)
Lincosamides (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Clindamycine, Lincomycine	Étroit (essentiellement coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif)
Macrolides (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Azithromycine, Clarithromycine Dirithromycine, Érythromycine, Josamycine, Midécamycine, Miokamycine, Oléandomycine, Roxithromycine, Spiramycine, Tilmicosine, Tylosine.	Étroit (essentiellement coques à Gram positif, coques à Gram négatif, bacilles à Gram positif)
Nitrofuranes (Inhibition de la synthèsede l'ADN)	Furaltadone, Furazolidone, Nifuroxazide, Nitrofurantoïne Nitrofurazone.	Large.
Novobiocine (Inhibition de laréplication de l'ADN)	Novobiocine.	Étroit (coques et bacilles à Gram positif, coques à Gram négatif).
Phénicolés (Inhibition de la synthèsedes protéines)	Chloramphénicol Florfénicol Thiamphénicol.	Large
Pleuromulines (pleuromutilines)	Tiamuline, Valnémuline	Large
Polypeptides (Action sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif et/ou sur la membrane cytoplasmique)	Polymyxine B et colistine	Étroit (bactéries à Gramnégatif)
	Bacitracine, Gramicidine Tyrocidine	Étroit (bactéries à Grampositif et à Gram négatif)
Quinolones et fluoroquinolones (Inhibition de la synthèsede l'ADN par blocage del'ADN gyrase et de la topoisomérase IV)	**Quinolones de 1ère générati :** Acide nalidixique, Acide oxolinique, Acide pipémidique, Acide piromidique, Fluméquine	Étroit (bacilles à Gramnégatif)
	Nouvelles quinolone Ciprofloxacine, Danofloxacine Difloxacine, Énoxacine, Enrofloxacine, Fléroxacine, Levofloxacine, Loméfloxacine Marbofloxacine, Norfloxacine Ofloxacine, Orbifloxacine ,	Large

Annexe 2 : Préparation de 1 ml de la matrice MALDI

-Dans un tube polypropylène 1.5 ml, introduire 2 pointes de spatules d'alpha-cyano-4-Hydroxycinnamic acid (HCCA).

-Ajouter 500 µl d'acétonitrile HPLC.

-Ajouter 475 µl d'eau HPLC.

-Ajouter 25 µl de TFA (trifluoroacetic acid)

-Vortexer ou secouer vigoureusement.

-Soniquer 10 min puis centrifuger 5 min à 13000 g.

-Transférer le surnageant dans un tube polypropylène 1.5 ml propre.

Annexe 3 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE **(http://www.biomerieux.com).**

Tests	Substrat	*Enzymes/Réactions*	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitratedepotassium	*Réduction des nitrates en nitrites*	**NIT 1 + NIT 2 / 5 mn**	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrates en azote	**ZN /5 mn**	
			Incolore	Rose
TRP	Tryptophane	*Formation d'indole*	**TRP / 3-5 mn**	
			Incolore	Rose / rouge
GLU	Glucose	*Fermentation*	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	*Arginine dihydrolase*	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	*Uréase*	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	*Hydrolyse (β-glucosidase)*	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	*Hydrolyse (protéase)*	Pas de diffusion du pigmen	Diffusiondu pigment noir
PNPG	p-Nitro-phényle-βD-Galactopyranoside	*B-galactosidase*	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	*Assimilation*	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Potassium Gluconate			
CAP	Acide Caprique			
ADI	Acide Adipique			
MLT	Acide Malique			
CIT	Trisodium Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phenylène diamine	*Cytochrome oxydase*	Incolore	Violet