

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2018

N° 50

Caractérisation phénotypique des bêtalactamases de souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de divers produits

MEMOIRE

POUR OBTENTION DU MASTER II DE MICROBIOLOGIE
FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

PRESENTE ET SOUTENU PUBLIQUEMENT

LE 18 AVRIL 2018

PAR

Dr Habibou SARR

(Ancien interne des hôpitaux)

MEMBRES DU JURY

Président :	M.	Ahmad Iyane	SOW	Professeur
Membres :	Mme	Roughyatou	KA	Maître de Conférences Agrégé
	Mme	Halimatou	DIOP	Maître de Conférences Agrégé
Directrice :	Mme	Roughyatou	KA	Maître de Conférences Agrégé

*Au nom d'Allah Le Tout
Puissant.*

*Paix et Salut sur Son Prophète
Mohamed.*



DEDICACES

A la mémoire de...

Mon honorable grand-mère feu Codou Salla DIENG, ton image plane encore dans mon esprit, tes conseils me manquent énormément. J'aurai tant voulu que tu sois là pour partager ce moment de joie avec nous. Votre neveu récolte ce jour le fruit de vos prières. Qu'Allah vous accueille dans son paradis céleste. Amin

Je dédie ce travail...

A ma chère maman, Aïssatou Ndiaye dit « Mbéne Ndiaye »,

Adorable maman tu m'as inspiré et m'as donné la force et le courage de terminer ce travail.

L'amour, la tendresse, la générosité et le soutien à tous les membres de la famille font de toi la meilleure maman.

Tu m'as boosté quand j'avais plus d'énergie, m'encourager quand j'étais découragé et me reconforter dans les moments les plus difficiles de ma vie à la fac.

Mon attachement et mon amour envers toi ne peuvent être exprimés ou traduits par ces quelques mots.

Merci de m'avoir toujours donné le souffle de m'être battu et de continuer à me battre pour aller de l'avant.

Merci pour tous...

Enfin...Merci tout simplement d'être ma Maman.

Je prie Allah le Tout Puissant de t'accorder santé et longue vie afin que tu puisses célébrer avec toute la famille l'aboutissement de tant de sacrifices et de privation, le fruit de l'arbre que tu as si bien entretenu.

Amín !!!

A mon cher père, Malick Sarr,

Aucune expression ne saurait démontrer l'amour, la reconnaissance, le respect et l'estime que je porte envers toi.

Ta présence et ta protection m'ont toujours réconfortée.

Tu as consenti tant de sacrifices, de patience, de bienveillance, d'investigation et d'encouragement à mon éducation et ma formation.

J'espère en ce jour être ta fierté.

Qu'Allah le Tout Puissant te procure santé et longue vie.

A ma chérie Bator Ndiaye

Ce travail t'est particulièrement dédié, trouves y tous mon amour et ma reconnaissance envers toi. Puisse notre union résister à l'épreuve du temps et Qu'Allah le Tout Puissant veille sur cette union. Je t'aime...

A mes frères Moustapha, Kabirou, Lamine, Cheikh Tidiane, Modou, Ahmadou, Ibrahima...

A mes sœurs Anta, Awa, Mariama, Khady, Seynabou, Astou Mbéne..

Pour tout l'amour, le soutien et le bonheur que vous réveillez en moi,

J'ai toujours apprécié l'affection que vous portez à mon égard,

Que ce travail soit le témoignage de mon amour et ma gratitude envers vous

Ce travail vous est dédié

A mes oncles et tantes, pour tous les principes que vous m'avez transmis.

A mes cousins et cousines, pour votre présence constante à mes côtés.

A tous mes amis avec qui j'ai partagé des moments de peine et de joie à la fac : Dame Dia, Abdou Diouck, Khadim Ndiaye, Alexis Papis Sambou, Amath Sakho ... Que nos liens d'amitié perdurent pour toujours.

A mes camarades et collègues de l'Internat : Abdoulaye Diop, Dame Gambe, Bambo Diakhaby, Serigne M Gueye, Pape M Kandji, Serigne M M Sow, Abdou Diop,...



REMERCIEMENTS

Je remercie du fond du cœur le Pr Ahmad IYANE SOW Chef de service du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital FANN pour avoir eu comme laboratoire d'accueil votre labo et pour le soutien apporté.

Je tiens à remercier le Pr Rouguyatou KA pour avoir accepté de diriger ce travail malgré vos multiples obligations professionnelles. C'est un honneur pour moi d'avoir été guidé par vos connaissances en microbiologie. Je vous remercie sincèrement du fond du cœur.

Je remercie également Pr Mouhamadou Lamine DIA pour tous vos conseils.

Je tiens également à remercier les Docteurs : Aïssatou A. NIANG, Baïdy DIEYE, Amadou DIOP, Fatoumata DIALLO...

L'occasion m'est également donnée de pouvoir remercier tout le personnel du laboratoire de bactériologie-virologie : Tonton COLY, Major Bineta G. GAYE, Mme DIA, Mme SAMB, Mme Bass, Mme LY, Mme FALL, Mme KAMARA, Ndaté SEYE, Elisa LOCCA, Mbathio NDIAYE, Abdou DIEME... Leur bonne humeur de tous les jours et la joie de les retrouver au laboratoire m'a permis de réaliser ce travail dans une atmosphère que je n'oublierai pas.

Merci à tous...

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre maître et président du jury.

Le Professeur Ahmad Iyane SOW

C'est pour nous une grande fierté de vous avoir comme président du jury.

Votre humilité, votre générosité, vos qualités scientifiques et humaines sont connues et reconnues de tous. Trouvez en ces mots l'expression de notre plus grand respect et de notre haute considération.

Soyez assuré de notre admiration cher maître. Puisse Dieu vous prêter longue vie. Amin !

A notre Maître et Directrice de mémoire

Le Professeur Roughyatou KA

Vous nous avez encadré et accompagné durant ce travail, votre soutien, vos conseils et encouragements nous ont permis de terminer à bien ce travail.

Votre humilité, votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines ne sont plus à démontrer. Trouvez en ces mots l'expression de notre plus grand respect. Puisse Dieu vous prêter longue vie. Amin !

A notre Maître et Juge

Le Professeur Halimatou DIOP

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail.

Durant notre cursus en pharmacie nous avons apprécié votre humilité, votre simplicité, vos qualités scientifiques et humaines sont connues et reconnues par tous les étudiants ayant bénéficié vos enseignements.

Soyez assuré de notre admiration et de notre profond respect.

Puisse Dieu vous prête longue vie. Amin !

Liste des abréviations

ABG	: Antibiogramme
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AMC	: Amoxicilline + acide clavulanique
BES	: Brazilian Extended-Spectrum Bêtalactamase)
BGN	: Bacilles à Gram Négatif
BLSE	: Bêtalactamases à Spectre Elargi
C3G	: Céphalosporines de troisième Génération
CAZ	: ceftazidime
CHNU	: Centre Hospitalier National Universitaire
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CRO	: Ceftriaxone
CTX	: Cefotaxime
CTX-M	: Céfotaximase –Munich
DA	: Désaminase
EBLSE	: Entérobactéries Productrices de Bêtalactamases à Spectre Elargi
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EPEC	: <i>Escherichia coli</i> entéropathogène
ETEC	: <i>Escherichia coli</i> entérotoxinogène
FEP	: Cefepime
GES	: Guyana Extended-Spectrum Bêtalactamase
IAS	: Infections Associées aux Soins
IMP	: Imipenème
LPS	: Lipopolysaccharides
MBL	: Métallo-Bêtalactamases
MH	: Mueller Hinton
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PER	: <i>Pseudomonas</i> Extended Resistance
PLP	: Protéines Liants les Proteines
RDD	: Rapprochement Des Disques
SHV	: Sulfhydryl Variable

TDA : Tryptophane Désaminase
TRI : TEM Résistantes aux Inhibiteurs
USI : Unités de Soins Intensifs
VEB : Vietnam Extended-Spectrum Bêtalactamase
VP : Voges Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale des bêtalactamines	11
Figure 2 : Mécanisme d'hydrolyse d'une bêtalactamines par une bêtalactamase.....	13
Figure 3 : Prévalence d'entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi dans le monde entre 2002 et 2009	15
Figure 4 : Galerie classique d'identification	31
Figure 5 : Image de « bouchon de campagne ».....	33
Figure 6 : Mise en évidence d'une bêtalactamase de classe.....	33
Figure 7 : Répartition des souches selon le sexe.....	34
Figure 8 : Répartition des souches selon la classe d'âge	34
Figure 9 : Répartition des souches selon l'origine des prélèvements.....	35
Figure 10 : Répartition des souches selon la nature du prélèvement.....	35
Figure 11 : Répartition des souches selon l'espèce.....	36
Figure 12 : Répartition des souches selon la classe de bêtalactamases.....	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des entérobactéries.	6
Tableau II : Caractères biochimiques de quelques entérobactéries	8
Tableau III : Classification des bêtalactamines.....	14
Tableau IV : Bêtalactamines : Comportement habituel en fonction du type de bêtalactamase.	21
Tableau V : Antibiogramme d'entérobactérie : charges et diamètres d'inhibition correspondant des différents disques testés	32
Tableau VI : Nombre d'espèces d'entérobactéries selon la classe de bêtalactamases.....	37
Tableau VII : Répartition des classes de bêtalactamases selon la provenance.	37

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE	4
I. ENTEROBACTERIES	5
1. Généralités	5
1.1. Définition	5
1.2. Historique	5
1.3. Classification	5
1.4. Habitat	6
2. Caractères bactériologique des entérobactéries	7
2.1. Morphologie	7
2.2. Culture	7
2.3. Biochimie	7
2.4. Antigènes.....	9
3. Pouvoir pathogène	10
4. La résistance aux bêtalactamines.....	11
II. LES BETALACTAMASES A SPECTRE ELARGI(BLSE)	13
1. Définition.....	13
2. Classification des bêtalactamases à spectre élargi.....	13
3. Epidémiologie sur les EBLSE	14
4. Différents types de BLSE.....	16
4.1. Anciennes BLSE	16
4.2. Nouvelles BLSE	17
5. Spectre d'inactivation des bêtalactamases à spectre élargi	20
III. CLASSIFICATION DES BETALACTAMINES.....	22
1. Les pénicillines (pénames)	23
2. Les pénèmes	25
3. Céphalosporines (céphèmes)	25
4. Les monobactames	27
DEUXIEME PARTIE	28
I. CADRE, TYPE ET PERIODE D'ETUDE	29
1. Cadre d'étude.....	29
2. Type et période d'étude	29

II. MATERIELS ET METHODE	29
1. Matériels	29
1.1. Echantillonnage	29
1.2. Interprétation des résultats	29
2. Méthodologie.....	30
2.1. Sélection des souches d'entérobactéries.....	30
2.2. Ré-isolément et ré-identification (Figure 4).....	30
2.3. Préparation de la solution d'EDTA	31
2.4. Antibiogramme.....	31
2.5. Principe de la détection des classes de BLSE	32
2.6. Interprétation des résultats	32
III. RESULTATS.....	34
1. Répartition des souches selon le sexe.....	34
2. Répartition des souches selon l'âge.....	34
3. Répartition des souches selon l'origine des prélèvements	35
4. Répartition des souches selon la nature du prélèvement	35
5. Répartition des souches selon l'espèce.....	36
6. Répartition des souches selon la classe de bêtalactamases.....	36
7. Répartition des espèces d'entérobactéries selon la classe de bêtalactamases	37
8. Répartition des classes de bêtalactamases selon la provenance.	37
DISCUSSION	38
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	42
PERSPECTIVES.....	45
REFERENCES.....	46



INTRODUCTION

L'acquisition par les bactéries de résistances aux antibiotiques représente un défi majeur pour la médecine du XXI^e siècle. L'augmentation croissante de l'incidence des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi (EBLSE), est à l'origine d'infections graves et responsable d'une prescription accrue d'antibiotiques à large spectre. Les bêtalactamases sont des enzymes constitutionnelles ou acquises, produites par les bactéries. Leur activité provoque l'ouverture du cycle beta-lactame et crée un intermédiaire acyl-enzyme instable qui est ensuite dégradé en acide inactif.

L'émergence et la dissémination de nouvelles bêtalactamases, premier mécanisme en cause dans la résistance des bactéries à Gram négatif (BGN) aux bêtalactamines, sont concomitantes à l'introduction dans l'arsenal thérapeutique et à la consommation des bêtalactamines. Ainsi, l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) en pratique clinique au début des années 1980, permettant de lutter contre les infections à germes producteurs de pénicillinases, a été suivie, dès 1983, de la description de la première bêtalactamase à spectre élargi (BLSE) chez *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne [1]. Plus de 200 BLSE ont maintenant été décrites et leur diffusion à travers le monde pose un véritable problème de santé publique [2]. Les BLSE sont des enzymes à large spectre, conférant une résistance à la quasi-totalité des bêtalactamines, excepté les céphamycines (difficiles à utiliser en thérapeutique) et les carbapénèmes. Jusqu'à la fin des années 1990, les entérobactéries productrices de BLSE étaient principalement des espèces dites « hospitalières », *Klebsiella pneumoniae* ou *Enterobacter spp*, et diffusant de façon clonale entre patients hospitalisés. Depuis le début des années 2000, l'émergence et la dissémination explosive de « nouvelles » BLSE (type CTX-M) sont observées au niveau mondial, avec un changement radical de l'épidémiologie. En effet, la diffusion des CTX-M au sein de l'espèce *Escherichia coli* a bouleversé l'épidémiologie classique des BLSE, avec une dissémination de telles souches dans la communauté [3 - 4].

Le défi majeur est aujourd'hui de limiter la propagation des entérobactéries productrices de BLSE en milieu communautaire et surtout hospitalier, ceci passe par l'identification et la réalisation d'un antibiogramme.

Notre étude a été réalisée au laboratoire de bactériologie-virologie du CHNU de FANN et repose sur la détection phénotypique des BLSE de classe A correspondant aux « pénicillinases » inhibées par l'acide clavulanique et les BLSE de classe B correspondant aux métallobêtalactamases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) chez les entérobactéries.

L'objectif général de notre étude était de caractériser les types de bêtalactamases secrétés par les entérobactéries multirésistantes isolées au laboratoire avec comme objectifs spécifiques une identification des principales EPC (Entérobactérie Productrice de Carbapénèmases) suspectes au laboratoire et l'instauration d'une technique de routine pour détecter les BLSE de classe B.

PREMIERE PARTIE

I. ENTEROBACTERIES

1. Généralités

1.1. Définition [5 - 7]

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante :

- bacilles à Gram négatif ;
- immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche ;
- aérobies anaérobies facultatifs ;
- se développant aisément sur milieu ordinaire ;
- fermentant le glucose avec sans production de gaz ;
- ne possèdent pas de cytochrome oxydase ;
- réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*).

1.2. Historique [8 - 10]

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* remonte en 1937 lorsqu'Otto RAHN proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà des noms tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*. Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Les travaux des équipes de DON BRENNER et de Patrick A.D. GRIMONT ont permis une véritable explosion de cette famille avec un très grand nombre de nouveaux genres et espèces décrits depuis une vingtaine d'années.

En 1972, EDWARDS et EWING rapportaient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*.

En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En 1985, FARMER et COLL décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

1.3. Classification

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres (**Tableau 1**) : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*.

Tableau I : Classification des entérobactéries.

Groupes		Genres	Espèces
GROUPE I	<i>EDWARDSIELLEAE</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>SALMONNELLEAE</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
GROUPE II	<i>ESCHERICHIEAE</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>LEVINEAE</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>KLEBSIELLEAE</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>PROTEAE</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>YERSINIEAE</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

1.4. Habitat [11 - 12]

Le nom d'entérobactéries a été donné parce que ces bactéries sont en général des commensaux ou des saprophytes, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux.

Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif des entérobactéries pouvant proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques.

2. Caractères bactériologique des entérobactéries

2.1. Morphologie [7 – 12 – 17 - 18]

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique ; bacilles à Gram négatif de 2-3 µm de long sur 0,6 µm de large, généralement polymorphes.

Les espèces mobiles les plus nombreuses le sont grâce à une ciliature péritriche. Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*.

La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des *fimbriae* ou *pili* qui sont des facteurs d'adhésion.

2.2. Culture [11 - 12 - 17 - 19]

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose.

Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R).

Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme.

En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon.

2.3. Biochimie [20].

L'identification des *Enterobacteriaceae* est d'abord basée sur des caractères biochimiques, complétés pour certains genres par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre ou l'espèce déterminée car les communautés antigéniques inter-genre et inter-espèce sont nombreuses (**Tableau 2**).

Tableau II : Caractères biochimiques de quelques entérobactéries [20].

	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. diversus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Morganella</i>	<i>P. rettgeri</i>	Providencia	Yersinia
Mobilité	+	+	+	+ /-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Gaz en glucose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+/-	+/-	-
Lactose	-	+ /×	+	+ /×	-	+	+ /×	-	-	-	-	-	-	-
Test ONPG	-	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
H2S	+ (-)	+ (-)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Uréase	-	- (+)	-	-	-	+/-	-	-	+	+	+	+	-	-/+
Ph.alamine DA et TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	+	+	+/-	- (+)	-	-	+	-	+	+	+	-
Citrate de Simmons	+ (-)	+	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	-	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+	+/-	+/-
Saccharose	-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	×	+/-	+/-	+/-	+/-
V.P	-	-	-	-	-	+ (-)	+	+	-	-	-	-	-	-

Légende :

+ = positif en 1 ou 2 jours ; (+) = positif tardivement ; - = négatif ; **DA** = désaminase ; **TDA** = tryptophane désaminase ; **V.P** = Voges Proskauer ;
 × = tardivement et irrégulièrement positif (fermentation due à des mutants) ; -(+) = en général négatif – exceptionnellement positif tard.

2.4. Antigènes [21]

La détermination du sérotype est réalisée pour des souches dont l'identification biochimique est certaine. Il existe différents antigènes :

❖ Les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistant à l'alcool ou à l'acide.

Les réactions d'agglutination se produisent lentement et sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

❖ Les antigènes H

Ce sont des antigènes qui ne sont présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermostables et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination se produisent rapidement et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

❖ Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B d'*E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de 2 heures.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

❖ L'antigène Kunitz

Cet antigène commun chez la famille des *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique.

Des antisérums dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant les méthodes de l'absorption spécifique des anticorps de Castelcani. Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinats. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que des anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène.

3. Pouvoir pathogène

Les entérobactéries constituent plus de 80 % des germes isolés en laboratoire : *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* et *Yersinia* sont les entérobactéries les plus souvent retrouvées.

❖ *Escherichia coli*

C'est un germe très courant. Son habitat est le colon humain. Sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement. Il est le genre préférentiel des infections urinaires. . L'incidence de ces infections est plus marquée chez les personnes de sexe féminin en milieu communautaire en raison notamment de la colonisation de la région péri-urétrale et de la longueur de l'urètre. En milieu hospitalier, l'incidence est égale entre les deux sexes en rapport essentiellement avec l'utilisation fréquente des sondes urinaires.

E. coli cause également des infections du tractus digestif notamment *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) qui est responsable de la diarrhée du voyageur et *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) responsable de diarrhées chez l'enfant, en raison de la contamination de l'eau ou des aliments par la flore fécale des malades ou des porteurs sains

E. coli est aussi à l'origine d'infections pulmonaires chez les personnes gravement malades par colonisation des voies respiratoires supérieures.

E. coli peut coloniser le vagin et être responsable des méningites néonatales (sérotype K1) après un accouchement ou suite à l'infection du liquide amniotique consécutive à une rupture prolongée des membranes.

❖ *Klebsiella pneumoniae*:

L'habitat de *K. pneumoniae* est le tractus digestif et le système respiratoire supérieur. Ce germe est principalement isolé en milieu hospitalier, le portage étant fortement accru chez les patients hospitalisés de longues périodes ou bénéficiant de traitements antibiotiques au long court. Toutefois, il est également présent en dehors des hôpitaux, notamment chez des patients diabétiques, ou souffrants de maladies respiratoires chroniques. Bien que la plupart des personnes colonisées soient asymptomatiques, *K. pneumoniae* peut causer des pneumonies, des bronchites et broncho-pneumonies, la contamination pulmonaire se faisant surtout par voie aérienne, mais la voie hématogène n'étant pas exclue. *K. pneumoniae* a été longtemps décrit comme le pneumo bacille de Friedlander. C'est une bactérie également retrouvée dans des

infections urinaires suite au passage de la flore fécale aux voies urinaires. Finalement, des bactériémies compliquent parfois les infections localisées mentionnées ci-dessus.

❖ *Klebsiella oxytoca*

Cette bactérie est isolée de produits pathologiques comme les urines, le sang et les sécrétions naso-pharyngées et trachéales. A l'instar de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* peut infecter les voies urinaires et respiratoires des patients hospitalisés.

❖ *Enterobacter cloacae*

C'est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux de la réanimation ou chez ceux qui sont sous traitement antibiotique au long cours. Il peut être à l'origine d'infections urinaires de pneumonies, ainsi que d'infection cutanées. Il peut également être responsable de bactériémies, et c'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années. Il est principalement isolé chez des patients en unité de réanimation et est le germe le plus incriminé dans les infections associées aux soins (IAS).

4. La résistance aux bêtalactamines [23].

Chez les bacilles à Gram-négatif(BGN) ; il existe des mécanismes de résistance aux bêtalactamines, principalement acquise : la faible affinité pour les PLP, les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux, et surtout l'inactivation enzymatique par des protéines, dénommées bêtalactamases en raison de leur affinité pour le noyau bêta-lactame (**Figure 1**).

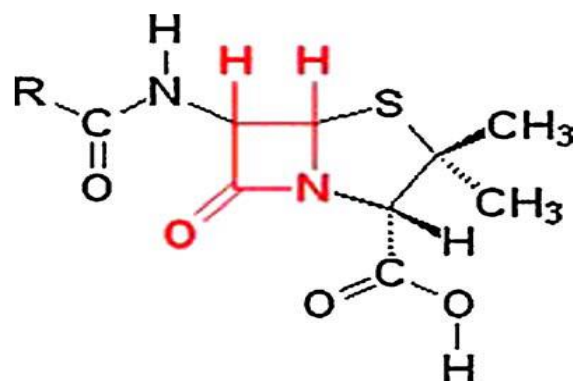


Figure 1 : Structure générale des bêtalactamines

Les gènes de résistance des bêtalactamases se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra-chromosomiques.

❖ **Résistance chromosomique [24]**

En ce qui concerne la résistance médiée par le chromosome bactérien, elle peut être due à une mutation spontanée ou à une recombinaison. La mutation est un changement fortuit dans la séquence des acides nucléiques qui peut par exemple transformer la molécule cible d'un antibiotique et rendre l'interaction avec l'antibiotique impossible. Quant à la recombinaison, elle consiste en un transfert de fragments de gènes d'un endroit du chromosome bactérien à un autre. Si ces fragments sont incorporés à des endroits bien précis, ils sont appelés intégrons, alors que s'ils se déplacent librement, il s'agit de transposons.

❖ **Résistance extra-chromosomique [24]**

La résistance peut provenir de l'acquisition d'ADN étranger par le biais de plasmides, bactériophages ou transposons. On parle alors de transfert horizontal de gènes de résistance et les mécanismes utilisés sont la conjugaison, la transduction et la transposition.

Les plasmides sont des éléments génétiques mobiles constitués de 10 à 400 paires de bases d'ADN. Ils sont autonomes dans la mesure où ils sont capables de se répliquer indépendamment. En effet, un plasmide peut établir une connexion entre une cellule donatrice et une cellule réceptrice, et être transféré dans la cellule réceptrice en même temps qu'il est répliqué dans la cellule donatrice où il demeure. Contrairement aux plasmides, les transposons sont des éléments génétiques incapables de se répliquer par eux-mêmes, mais qui peuvent passer d'un chromosome à un autre, ou d'un chromosome à un plasmide. Les plasmides et transposons déterminent la résistance aux antibiotiques. En effet, une bêtalactamase spécifique à une bactérie peut apparaître chez d'autres espèces par la suite, au vu du transfert relativement facile de matériel génétique entre les différentes bactéries.

II. LES BÉTALACTAMASES A SPECTRE ELARGI(BLSE)

1. Définition [23]

C'est le mécanisme prédominant de la résistance aux bêtalactamines chez les entérobactéries. Ce sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle beta-lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (**Figure 2**).

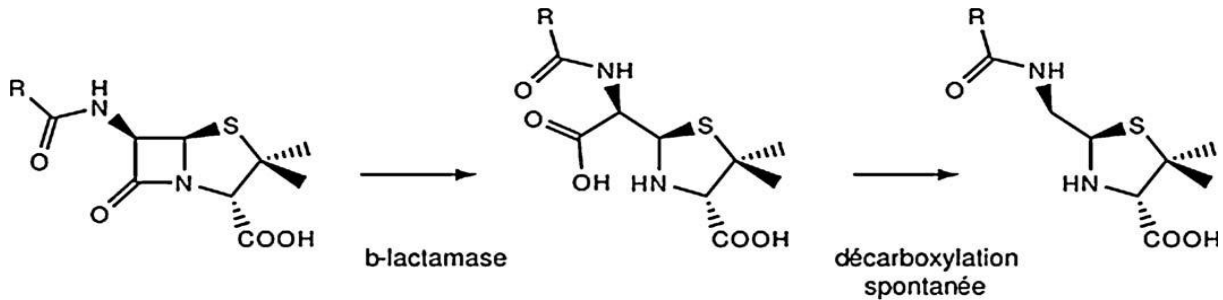


Figure 2 : Mécanisme d'hydrolyse d'une bêtalactamines par une bêtalactamase.

Deux systèmes de classification sont couramment acceptés, établis sur des bases fonctionnelles et moléculaires.

2. Classification des bêtalactamases à spectre élargi

La classification d'Amblar [25] comporte quatre groupes A, B, C et D (**Tableau 3**). Les bêtalactamases de classe A, C et D comporte une sérine active responsable de l'ouverture du cycle beta-lactame. À l'opposé, les bêtalactamases de classe B ont besoin d'un ou deux atomes de zinc ionisé (Zn^{2+}) pour hydrolyser leur substrat et sont ainsi couramment appelées sous le nom de « métallo-enzymes ».

Schématiquement, les bêtalactamases de classe A sont sensibles à l'action de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam qui sont des inhibiteurs des bêtalactamases. On y trouve la majorité des bêtalactamases retrouvées chez *E. coli*, comme TEM, SHV, des bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) comme les CTX-M, et des carbapénèmases comme KPC et certains variants de GES (mutation Gly170Ser ou Gly170Asn).

Les bêtalactamases de classe B sont principalement des carbapénèmases comme IMP et VIM, elles sont inhibées par l'EDTA.

Les bêtalactamases de classe C sont les céphalosporinases de type AmpC, inhibées par la cloxacilline.

Enfin les bêta-lactamases de classe D sont des oxacillinases, qui constituent une famille extrêmement composite en termes de spectre d'hydrolyse.

La classification de Bush et al. est plus ramifiée [26] notamment avec la présence de sous-classes pour les bêta-lactamases de classe A (**Tableau 3**).

Tableau III : Classification des bêta-lactamines selon Bush et al. [26], Ambler [25] et proposition de Giske et al. [27].

Type	Bush	Ambler	Giske	Inhibiteur	Exemple
Céphalosporinase de type AmpC	1	C	ESBL _{M-C}	Cloxacilline	AmpC des entérobactéries du groupe 3 et leurs dérivés plasmidiques
Pénicillinase des bactéries Gram positifs	2a	A	–	Clavulanate	Pénicillinase de <i>Staphylococcus aureus</i>
Pénicillinase à spectre étroit	2b	A	–	Clavulanate	TEM-1, SHV-1
Bêta-lactamases à spectre élargi	2be	A	ESBL _A	Clavulanate	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB, GES (170Gly)
Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs	2br	A	–	–	TEM-30
Complex mutant TEM	2ber	A	ESBL _A	–	TEM-50
Carbénicillinases	2c	A	–	Clavulanate	PSE-1
Oxacillinases	2d	D	–	–	OXA-1
Céfuroximasés	2e	A	–	Clavulanate	Céphalosporinase de <i>Proteus vulgaris</i>
Carbapénémases	2f	A	ESBL _{CARBA-A}	Clavulanate	KPC, GES (170Ser et 170Asn)
Métallo-bêta-lactamases	3	B	ESBL _{CARBA-B}	EDTA	VIM, IMP
Autres bêta-lactamases non classées	4	–	–	–	Pénicillinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

Le terme BLSE, qui recouvrait les enzymes de type TEM et SHV, a été lui-même étendu aux CTX-M qui ne dérivait pourtant pas de bêta-lactamases à spectre étroit. Ainsi, « BLSE » a progressivement désigné les bêta-lactamases de classe A d'Ambler présentant un large spectre d'hydrolyse comprenant notamment les C3G.

3. Epidémiologie sur les EBLSE

Un aperçu à grande échelle de la prévalence des EBLE dans les différentes régions du monde (**figure 3**) montre une répartition inhomogène à l'échelle mondiale, avec par ordre décroissant de prévalence, l'Amérique du Sud, l'Asie/région pacifique, l'Europe et les Etats-Unis [13]. Il existe quelques données provenant d'études régionales pour le continent africain qui laissent présager d'une forte prévalence [14]. Ces aspects descriptifs de prévalence, confirment l'isolement constamment croissant de souches d'EBLSE dans les prélèvements à visée diagnostique au cours de la dernière décennie [15].

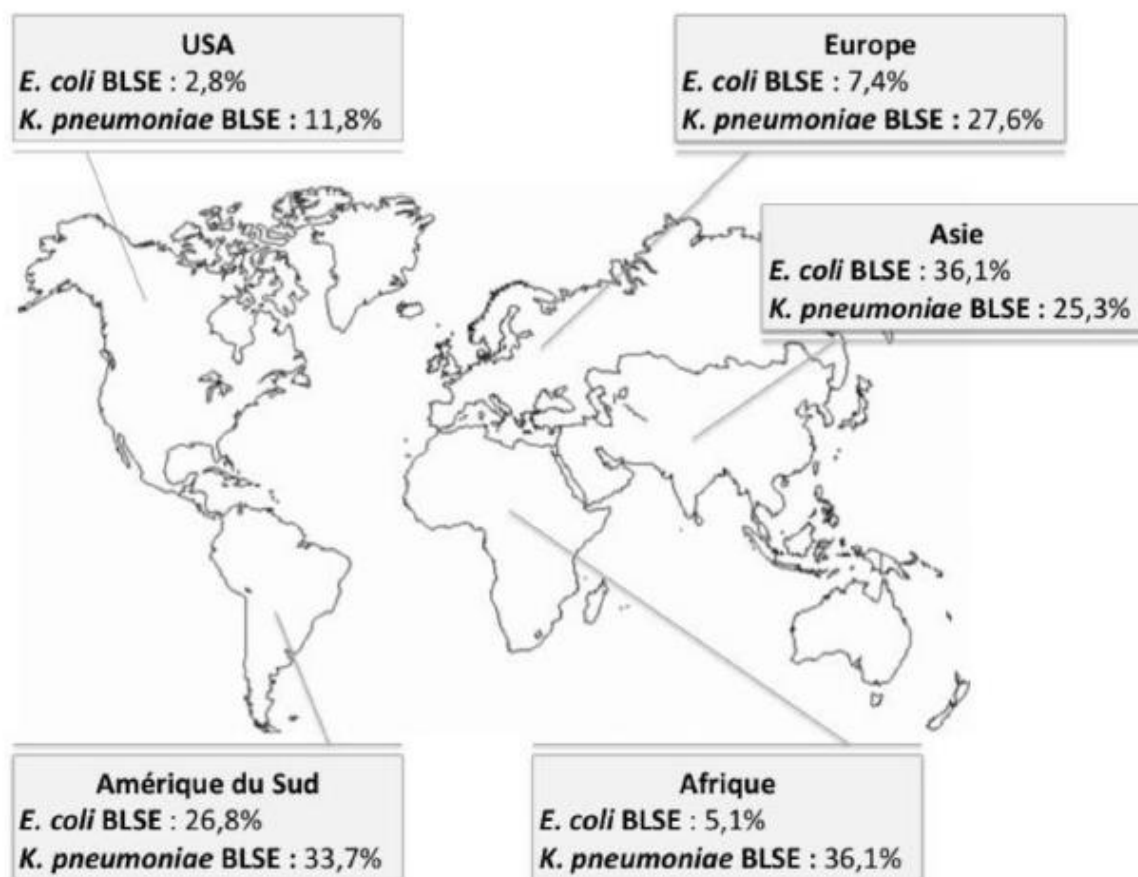


Figure 3 : Prévalence d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi dans le monde entre 2002 et 2009 [14 - 15].

La prévalence de la colonisation ou le portage des EBLSE chez des sujets sains non infectés est plus difficile à évaluer que celles de ces mêmes bactéries responsables d'infections, en l'absence d'études sur de larges cohortes internationales. La prévalence des porteurs sains en communauté varie entre les régions. En Afrique, une étude réalisée sur 20 enfants d'un village rural au Sénégal retrouvait, en se basant sur les coprocultures, une prévalence de 10 % d'*Escherichia coli* productrice de BLSE [16].

Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1/2 et de SHV-1 après évolution de ces enzymes «anciennes» par mutation(s) ponctuelle(s) [28]. Les souches productrices de BLSE étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment en unités de soins intensifs (USI). La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Enfin, les facteurs de risque principaux étaient : L'admission en USI, l'hospitalisation prolongée, la chirurgie abdominale, le cathétérisme IV, le sondage

urinaire, la ventilation assistée, l'hémodialyse, l'utilisation de céphalosporines/ aminosides [29 - 30].

A partir de 1995, de « nouvelles » BLSE (notamment CTX-M) ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des souches d'*E. coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsables d'infections communautaires, notamment urinaires [31].

De plus, le nombre de souches productrices de BLSE augmente aussi dans les services hospitaliers hors USI, notamment dans les services de long et moyen séjour. D'autres facteurs de risque ont été identifiés, comme l'utilisation des fluoroquinolones [27]. Enfin, contrairement aux BLSE de type TEM/SHV, les mécanismes de diffusion de CTX-M semblent plus complexes, mettant en jeu plutôt la diffusion de plasmides (épidémies de plasmides) et/ou d'autres éléments génétiques mobiles que la diffusion unique d'un clone bactérien [30 - 32]. Les autres BLSE (ex. PER, VEB) restent plus rares et sont principalement détectées chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* [22 - 33].

4. Différents types de BLSE

4.1. Anciennes BLSE

❖ BLSE de type TEM (Temoneira)

De nombreux dérivés de TEM-1/2 (> 150) ont été décrits à ce jour, dont plus de 100 avec un phénotype de BLSE. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* [34 - 35]. En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* [30]. Les mutations responsables de l'élargissement de spectre ont généralement lieu au niveau de 4 «hot spots» de la protéine (positions 104,164, 238 et 240) [28]. A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs des bêtalactamases, ce sont les TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) [34].

❖ BLSE de type SHV (Sulphydryl Variable)

La majorité des dérivés de SHV-1 (> 60) ont un phénotype de BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe [30]. Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* [34 - 35]. Comme les dérivés de TEM, les mutations dans SHV-1 (68% d'identité avec TEM-1) ont lieu classiquement au niveau de quelques positions (notamment 238 et 240) [28].

Enfin, le gène codant pour SHV-12 a été décrit en association avec le déterminant plasmidique de résistance aux quinolones, QnrB [30].

4.2. Nouvelles BLSE

❖ BLSE de type CTX-M (Céfotaximase -Munich)

Ces enzymes «émergentes» pourraient représenter très prochainement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 [34 – 35 – 36 - 37]. Au niveau de leur spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement le cefotaxime, d'où leur nom de céfotaximases [36]. En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au cefotaxime (CMI > 64 µl/mL) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 µl/mL), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables [33]. Au niveau structural, les CTX-M ne sont pas proches des bêtalactamases de type TEM ou SHV (< 40 % d'identité) [36]. A ce jour, de nombreuses variantes de CTX-M ont été décrits (>50), et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45 [38].

Les enzymes Toho-1/2, décrites au Japon, sont très proches structurellement des CTX-M et sont donc classées parmi celles-ci [36]. A noter que certaines variantes (ex. CTX-M-15, CTX-M-32) avec une activité de ceftazidimase élevée (CMI > 256 µl/mL) ont été décrit (mutation ponctuelle en position 240) [36 - 38].

Les progéniteurs des CTX-M ont été identifiés sur le chromosome de *Kluyvera spp.* qui est une entérobactérie non pathogène environnementale. En effet, les progéniteurs des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* et *K. georgiana*, tandis que les sources des CTX-M des groupes 25 et 45 restent inconnues [39]. Depuis leurs progéniteurs, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles type séquence d'insertion (ex. *ISEcp1*, *ISCR1*) ou à des phages, et transférés

sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes [28 - 38 - 39]. Les souches productrices de CTX-M ont été initialement rapportées de façon sporadique à la fin des années 80 au Japon (FEC-1), en Europe (MEN-1, CTX-M-1) et en Argentine (CTX-M-2) [36].

❖ BLSE de type PER (*Pseudomonas Extended Resistance*)

L'enzyme PER-1, initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie, est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. mais a aussi été détectée chez *S. enterica* sérovar Typhimurium, *Providencia* spp, *Proteus mirabilis* et *Alcaligenes faecalis* [22]. En Turquie, une étude récente a montré que 32 % des souches résistantes à la ceftazidime de *P. aeruginosa* et 55 % de celles de *A. baumannii* étaient productrices de PER-1 [33]. Une seconde enzyme, PER-2 (86 % d'identité avec PER-1), a été détectée en 1996 chez *S. enterica* sérovar Typhimurium en Argentine, et depuis chez d'autres entérobactéries, *Vibrio cholerae* et *A. baumannii* [22 - 33]. Tandis que PER-1 est surtout présente en Turquie et en Corée du Sud (quelques cas décrits en Italie, France et Belgique), PER-2 n'a été détectée qu'en Amérique du Sud. Enfin, une souche de *P. aeruginosa* produisant à la fois PER-1 et la carbapénèmase VIM-2 a été détectée en Italie [22].

❖ BLSE de type VEB (*Vietnam Extended-spectrum Betalactamase*)

L'enzyme VEB-1 (38 % d'identité avec PER-1) a été retrouvée en 1996 chez une souche d'*E. coli* isolée chez un patient vietnamien puis chez *P. aeruginosa* en Thaïlande [22 - 33]. A ce jour, 4 dérivés de VEB-1 ont aussi été décrits (VEB-2 à VEB-5). VEB-1 a été détectée chez *P. aeruginosa* au Koweït, en Chine, en Inde et au Bangladesh, chez *A. baumannii* en France, en Belgique et en Argentine, chez *P. stuartii* en Algérie, chez *Enterobacter cloacae* et *Achromobacter xylosoxidans* en France, et chez *E. coli* au Canada [33]. Plusieurs épidémies nationales ont été rapportées : *A. baumannii* VEB-1 en France et en Belgique ; *P. mirabilis* VEB-1 en Corée du Sud ; et *E. cloacae* en Chine. Enfin, à noter que le gène codant pour VEB-1 est souvent localisé au sein d'un intégron et peut donc être associé à d'autres gènes de résistance comme *qnrA*, déterminant plasmidique de la résistance aux quinolones [33].

❖ BLSE de type GES (*Guyana Extended-Spectrum Betalactamase*)

Les BLSE de type GES sont de plus en plus rapportées chez les BGN, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*. GES-1 a été initialement décrite chez une souche de *K.*

pneumoniae isolée en 1998 en France puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays-Bas [10d]. A ce jour, 9 variants différents ont été décrits dont GES-2 en Afrique du Sud, GES-5 à GES-8 (GES-7 = IBC-1 ; GES-8 = IBC-2) en Grèce, GES-3 et GES-4 au Japon, GES-5 en Corée du Sud, en Chine et au Brésil, et GES-9 en France [33]. A noter que, contrairement à la plupart des BLSE, GES-1 n'hydrolyse pas l'aztréonam et surtout GES-2 hydrolyse les carbapénèmes en étant moins sensible aux inhibiteurs des bêtalactamases. Par une unique mutation, GES-2 est le premier exemple de BLSE avec un élargissement du spectre d'activité aux carbapénèmes ; depuis, 4 autres dérivés ont été décrits (GES-4 à GES-6, GES-8) [33]. De façon inquiétante, des souches de *P. aeruginosa* produisant GES-1 et la carbapénémase VIM-11 et de *E. coli* produisant GES-7 et la carbapénémase VIM-2 ont été décrites respectivement en Argentine et en Grèce. Enfin, plusieurs épidémies de BGN producteurs de BLSE de type GES ont été rapportées : *K. pneumoniae* en Corée du Sud, au Portugal et en Grèce, *S. marcescens* aux Pays-Bas, et *P. aeruginosa* en Afrique du Sud [33].

❖ Autres BLSE de classe A

L'enzyme SFO-1 (*Serratia fonticola*) n'a été détectée qu'une seule fois chez une souche de *E. cloacae* isolée au Japon en 1988 [33].

L'enzyme BES-1 (Brazilian extended-spectrum β -lactamase) n'a été isolée qu'une seule fois à partir d'une souche de *S. marcescens* au Brésil en 1996 [33].

L'enzyme BEL-1 (Belgium extended-spectrum β -lactamase) a été identifiée dans une souche de *P. aeruginosa* en Belgique en 2004. De récents travaux suggèrent que le gène codant pour BEL-1 pourrait disséminer dans les souches de *P. aeruginosa* en Belgique [33].

L'enzyme TLA-1 (Tlahuicas - tribu indienne) a été décrite dans une souche de *E. coli* isolée au Mexique en 1993. Depuis, plusieurs cas de bactériémies et d'infections urinaires nosocomiales dues à une souche de *K. pneumoniae* produisant à la fois SHV-5 et TLA-1 ont été rapportés au Mexique. A noter que TLA-1 n'a été identifié qu'au Mexique [33].

Le gène codant l'enzyme TLA-2 est porté par un plasmide de 47 kb (pRSB101) isolé à partir d'eaux usées de traitement de plantes en Allemagne en 2002.

Cependant, l'espèce hébergeant ce déterminant n'a pas pu être identifiée et aucune souche TLA-2-positive n'a été décrite à ce jour.

❖ BLSE de type OXA (Oxacillinase)

Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillinases (classe D et classe 2d) ont des propriétés de BLSE [34 - 35 - 40]. Les bêtalactamases de type OXA confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céfalotine, et sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline). De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique [35]. La plupart des bêtalactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV2, [33].

Les bêtalactamases de type OXA représentent une famille phylogénétiquement très hétérogène et les BLSE de type OXA dérivent de OXA-10, de OXA-13, de OXA-2 ou sont non reliées (OXA-18, -45) [35 - 33]. Bien que la plupart des BLSE dérivées de OXA-10 confèrent une résistance plus élevée au cefotaxime, les activités enzymatiques des BLSE de type OXA sont très variables. Les BLSE de type OXA sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont aussi été détectées chez d'autres BGN dont les entérobactéries [35 - 33]. Découvertes initialement chez *P. aeruginosa* en Turquie, elles ont ensuite été décrites en France, à Taïwan, en Corée et aux Etats-Unis. Malheureusement, très peu d'études épidémiologiques ont été menées pour évaluer la dissémination des BLSE de type OXA [33].

5. Spectre d'inactivation des bêtalactamases à spectre élargi

Devant un phénotype de résistance de type pénicillinases, il y a lieu de distinguer les enzymes de la classe A, sensibles aux inhibiteurs enzymatiques : acide clavulanique ou tazobactam par exemple de celles résistantes comme les pénicillinases de classe D. Devant une résistance aux C3G (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), il y'a des différences de comportement en particulier pour les C4G entre BLSE, céphalosporinase hyper-produite (CASE HP), céphalosporinase à spectre élargi (CASESE) et carbapénèmase (CARB) (**Tableau 4**).

Tableau IV : Bêtalactamines : Comportement habituel des entérobactéries en fonction du type de bêtalactamase.

	PASE	BLSE	CASE	CASE HP	CASE SE	CARB
Amoxicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + AC	S/I/R	S	R	R	R	R
Ticarcilline	R	R	S	R	R	R
Ticarcilline + AC	S/I/R	S	S	R	R	R
Pipéracilline	R	R	S	R	R	R
Pipéracilline + PTZ	S/I/R	S	S	R	R	R
Céfalogtine	I/R	R	R	R	R	R
Céfamandole	I/R	R	S	R	R	R
Céfuroxime	S/I	R	S	R	R	R
Céfoxitine	S	S	R	R	R	R
Céfotaxime	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime	S	R	S	R	R	R
Céfépime	S	R	S	S	R	R
Cefpirome	S	R	S	S	R	R
Aztréonam	S	R	S	R	R	V
Imipénème	S	S	S	S	S	R
Méropénème	S	S	S	S	S	R
Ertapénème	S	S	S	S	S	R

PASE: pénicillinase; BLSE: bêta-lactamase à spectre élargi/étendu; CASE: céphalosporinase inductible; CASE HP: céphalosporinase hyperproduite ou plasmidique; CASE SE: céphalosporinase à spectre élargi/étendu; CARB: carbapénèmase; R: résistant; S: sensible; I: intermédiaire; AC: acide clavulanique; PTZ: tazobactam.

III. Classification des bêtalactamines [41 - 42]

La famille des β -lactamines se compose de quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monobactames. On doit ajouter les inhibiteurs des bêtalactamases dont certains sont inclus dans ces quatre groupes.

La structure de base des bêtalactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame, indispensable à l'activité des molécules. Sur cette structure, est fixé un cycle penta-atomique saturé (péname), insaturé (pénème) ou hexa-atomique (céphèmes).

Le noyau azétidinone seul peut être substitué ; en fonction des substituants de l'atome d'azote, on distingue : les monophosphatames et d'autres hétérocycles. Actuellement, du fait de la complexité de ce groupe, il est dénommé monolactame.

Les **pénames** composés par :

- Les pénicillines :
 - Pénicilline G (pénicilline G, extencilline)
 - Pénicilline A (ampicilline, amoxicilline)
 - Pénicilline M (oxacilline, méticilline) : résiste à la pénicillinase des staphylocoques
 - Carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline)
 - Ureïdopénicillines (pipéracilline, mezlocilline)
 - Amidinopénicillines (pivmécillinam, mécillinam)
- Les Méthoxy-pénames (témocilline)
- Les Oxapénames (acide clavulanique)
- Les Carbapénames.

Les **pénèmes** composés par :

- Les carbapénèmes : imipenème, méropénème
- Sulfopénèmes
- Oxapénèmes

Les **céphèmes** comprenant :

- Les céphalosporines avec quatre générations :
 - 1^{ère} génération : céfalotine, céfazoline
 - 2^{ème} génération : céfuroxime, céfamandole
 - 3^{ème} génération : cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime
 - 4^{ème} génération : céfépime, cefpirome
- Les oxacéphèmes : lamoxactam
- Les céphamycines : céfotétan
- Les carbacéphèmes

Les **monobactames** comprenant :

- Les monobactames : aztréonam
- Les nocardicines
- Les monophosphames
- Les monocarbames
- Les monosulfactames

1. Les pénicillines (pénames) [43]

Elles possèdent un cycle thiazolidine accolé au noyau β -lactame. Elles diffèrent par la nature de leur chaîne latérale.

❖ Pénicilline G

C'est la première pénicilline découverte par Fleming. Elle est produite par *Penicillium notatum*. Elle est active sur les cocci (à exception des staphylocoques dont la grande majorité produit maintenant une pénicillinase), la plupart des bacilles à Gram positif, les anaérobies.

- Pénicilline M

La méticilline fut le premier dérivé de la pénicilline capable de résister à la pénicillinase du staphylocoque. On peut citer également l'oxacilline et la cloxacilline. Ces produits ne sont indiqués que pour le traitement des infections à

staphylocoques sensibles à la méticilline (méti-S), car ils sont souvent moins actifs que la pénicilline G sur les autres bactéries. Le pourcentage de staphylocoques résistants à la méticilline (méti-R) est important en milieu hospitalier.

❖ **Aminopénicillines (pénicillines A)**

Leur spectre d'activité est élargi, par rapport à la pénicilline G, vers certains bacilles à Gram négatif (*H. influenzae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*), mais elles restent sensibles aux bêtalactamases souvent présentes chez ces bactéries. Dans ce groupe, on peut citer l'ampicilline et l'amoxicilline.

❖ **Carboxypénicillines**

Elles ont un spectre plus étendu que celui des aminopénicillines, vers les bacilles à Gram négatif. Elles peuvent en particulier agir sur *P. aeruginosa*. Elles restent sensibles aux pénicillinases, mais sont moins sensibles aux céphalosporinases. La première molécule de ce type fut la carbénicilline, remplacée maintenant par la ticarcilline. On l'utilise surtout pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*.

❖ **Ureïdopénicillines**

Elles comprennent principalement la mezlocilline et la pipéracilline. Leur spectre est assez proche de celui des carboxypénicillines. La pipéracilline a une bonne activité sur *P. aeruginosa*. Les ureïdopénicillines conservent une bonne activité sur les entérocoques.

❖ **Amidinopénicillines**

Elles comprennent le mécillinam et le pivmécillinam. Ces produits sont actifs sur certaines entérobactéries et ne sont utilisés que dans les infections urinaires.

❖ Inhibiteurs des bêtalactamases

Des molécules ayant une structure de pénicilline (mais dépourvues d'activité antibiotique significative) ont la propriété de se lier à certaines bêtalactamases (surtout plasmiques) et de les inhiber de manière irréversible. Leur association à des pénicillines permet de restaurer l'activité de ces dernières vis-à-vis de bactéries produisant ces bêtalactamases (*S. aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis* et diverses entérobactéries). Les inhibiteurs commercialisés sont : l'acide clavulanique (associé à l'amoxicilline ou la ticarcilline), le sulbactam (seul ou associé à l'ampicilline), le tazobactam (associé à la pipéracilline).

2. Les pénèmes

❖ Carbapénèmes

Dans ce groupe, seul l'imipénème est commercialisé en France. C'est un dérivé de la thiénamycine. Il est associé à la cilastatine pour prévenir sa dégradation au niveau du rein. L'imipénème est très actif sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. L'imipénème est résistant à la plupart des bêtalactamases, y compris les bêtalactamases à spectre élargi. Des résistances acquises sont apparues chez *P. aeruginosa*. De très rares souches d'entérobactéries et d'*Acinetobacter* capables de dégrader l'imipénème ont été décrites.

3. Céphalosporines (céphèmes)

Les céphalosporines sont constituées d'un noyau β -lactame associé à un noyau de dihydrothiazine. Elles résistent à la pénicillinase des staphylocoques comme les pénicillines M, mais sont inactives sur les souches méti-R. Elles peuvent agir sur les bacilles à Gram négatif à des degrés divers.

Les céphalosporines peuvent être classées de plusieurs manières :

- Classification de Wise ;
- Classification d'O'Callaghan ;
- Classification en générations.

Cette dernière classification est la plus courante. Une classification qui était basée sur la CMI.

Ainsi, on distingue :

- Les céphalosporines de 1^{ère} génération (comme la céfalotine) ont un niveau d'activité assez limité vis-à-vis des bacilles à Gram négatif, en raison de leur sensibilité aux céphalosporinases. Elles sont caractérisées par une CMI relativement basse (1 - 10 mg/l de sang).
- Les céphalosporines de 2^{ème} et surtout de 3^{ème} génération sont beaucoup plus actives. Parmi les céphalosporines de 2^{ème} génération, on peut citer la céfamandole et la céfuroxime ainsi que deux molécules classées parmi les céphamycines : la céfoxitine et le céfotétan. Ces deux dernières ont une bonne activité sur *B. fragilis* et sont résistantes aux bêtalactamases à spectre élargi. Le céfotétan est classé par certains parmi les céphalosporines de 3^{ème} génération. Leur CMI est plus basse que celle des céphalosporines de 1^{ère} génération (0,25 mg - 4 mg/l de sang).

Parmi les céphalosporines de 3^{ème} génération, on peut citer le cefotaxime, la ceftazidime et la ceftriaxone. Ces molécules sont, comme les pénicillines, très actives sur les *Neisseria*, les streptocoques et les pneumocoques, *S. aureus* que les céphalosporines de 1^{ère} génération. Leur résistance à la plupart des bêtalactamases leur permet d'être très actives sur de nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif (notamment *H. influenzae* et la plupart des entérobactéries). Vis-à-vis de *P. aeruginosa*, la ceftazidime est la seule active, avec la cefsulodine (céphalosporine qui n'est utilisée que dans cette indication). Les céphalosporines de 3^{ème} génération sont peu actives sur *Acinetobacter*,

inactives sur *Stenotrophomonas* et sur les bactéries hyperproductrices de céphalosporinases (céphalosporinases déréprimées, observées notamment chez *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *P. aeruginosa*). Elles sont caractérisées par une CMI encore plus basse que celle des céphalosporines de 2^{ème} et de 1^{ère} génération. Cette CMI est comprise entre 0,001 mg à 1 mg/l de sang.

Les céphalosporines les plus récentes, dites parfois de 4^{ème} génération (Cefepime, cefpirome) se montrent plus actives vis-à-vis des souches hyperproductrices de céphalosporinases. Mais toutes les céphalosporines de 3^{ème} génération sont inactivées à des degrés divers par les bêtalactamases à spectre élargi (produites surtout par certaines souches de *K. pneumoniae*).

4. Les monobactames

L'aztréonam a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies.

DEUXIEME PARTIE

I. CADRE, TYPE ET PERIODE D'ETUDE

1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée au laboratoire de Bactériologie-Virologie du Centre Hospitalier National Universitaire(CHNU) de Fann, Dakar qui comporte de nombreux services d'hospitalisation et un Centre de Diagnostic et d'Imagerie Médicale où est logé le laboratoire. Le laboratoire de Bactériologie-Virologie reçoit quotidiennement différents prélèvements en provenance de différents services d'hospitalisation (patients internes) et de patients suivis à titre externes.

2. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective de janvier à décembre 2017 portant sur la caractérisation phénotypique des bêtalactamases des souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de divers produits pathologiques reçus et traités au laboratoire.

II. MATERIELS ET METHODE

1. Matériels

1.1. Echantillonnage

Notre avons sélectionné des souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de produits pathologiques reçus au laboratoire à visée diagnostique. 50 souches d'entérobactéries ont été choisies selon les critères suivants :

❖ Critères d'inclusion

- Les souches d'entérobactéries multirésistantes.
- Les souches d'entérobactéries avec un phénotype BLSE.

❖ Critères de non inclusion

- Entérobactéries dont l'identification était ambiguë
- Entérobactéries avec un phénotype différent de BLSE

1.2. Interprétation des résultats

- Disques d'antibiotiques : amoxicilline + acide clavulanique (AMC), ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP), imipénème (IMP), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO).
- Disque vierge fait de papier buvard

- Solution d'EDTA 0,5 M, PH 7
- Pipette pasteur
- Pipette de 10µl + embouts jaune
- Eau physiologique
- Gélose Mueller Hinton
- Ecouvillons
- Etalon 0,5 McFarland
- Matériel et équipements de base d'un laboratoire de bactériologie

Les milieux utilisés sont conservés à 4°C et doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation.

2. Méthodologie

2.1. Sélection des souches d'entérobactéries

Les souches ont été sélectionnées suite à une identification de l'espèce et après réalisation d'un premier antibiogramme qui révélait une souche d'EBLSE, sensible ou résistant à l'imipénème. Le premier antibiogramme ne montrait pas l'image de « bouchon de champagne » entre le disque d'AMC et celui des C3G.

2.2. Ré-isolement et ré-identification (Figure 4)

Les souches sont ré-isolées sur milieu ordinaire (Mueller Hinton) afin de s'assurer de la pureté de la souche puis nous avons réalisé une coloration de Gram pour confirmer la morphologie des BGN.

La ré-identification est réalisée grâce à la galerie classique composé de Kligler Hajna (KH), Manitol-mobilité (MM), Citrate de Simmons (CS), Urée-tryptophane et l'eau peptonnée simple (EPS). La détermination de l'espèce d'entérobactérie est suivie de la réalisation d'un antibiogramme à la recherche des BLSE de classe A et B.

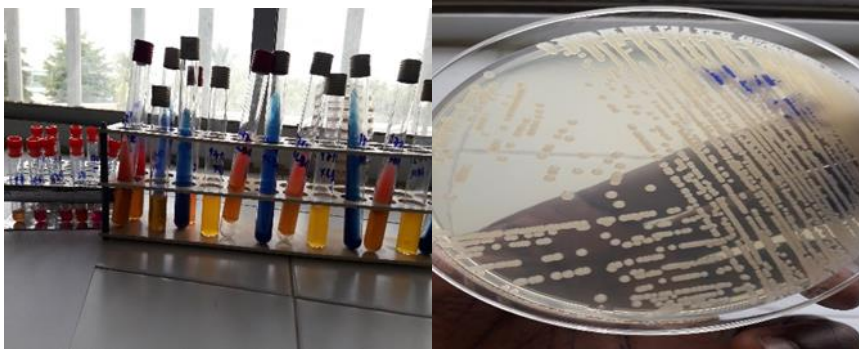


Figure 4 : Galerie classique d'identification

2.3. Préparation de la solution d'EDTA

- Préparation d'une solution stock de 500 ml d'EDTA 0.5 M pH : 7.0
- Peser 93.05 grammes d'EDTA poudre
- Dissoudre dans 400 ml d'eau ultra-pure (bidistillée) et stérilisée à l'autoclave
- Ajuster le pH à 8.0 avec de la soude (NaOH)
- Porter le volume à 500 ml avec l'eau ultra-pure

2.4. Antibiogramme

❖ Technique

L'antibiogramme est réalisé en préparant un inoculum bactérien à partir d'une souche d'entérobactérie isolée sur milieu Mueller-Hinton (MH). La densité de la suspension est ajustée à 0,5 McFarland. 1 ml de cette suspension est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir ainsi une dilution au 1/10^e.

Avec un écouvillon, on ensemence une gélose MH à partir de la dilution au 1/10^e.

Les disques d'antibiotique à testés (**Tableau 5**) sont disposés ainsi :

- Recherche de BLSE de classe A : Le disque d'AMC est déposé au centre de la boîte entouré des disques de C3G (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime) à une distance de 20 mm du disque central (AMC).
- Recherche de BLSE de classe B : Deux disques d'imipénème ont été déposés suffisamment distants (plus de 30mm) sur la même boîte de pétri, l'un comme témoin, et sur l'autre, un volume de 10µl d'une solution d'EDTA est déposé sur la même boîte ; dont le but est de faire une comparaison des diamètres d'inhibitions obtenus autour des deux disques. La lecture se fait après 24 heures d'incubation à l'étuve (37°).

-

Tableau V : Antibiogramme d'entérobactérie : charges et diamètres d'inhibition correspondant des différents disques testés

Antibiotiques	Charge du disque (μg)	Diamètres critiques (mm)	
		S	R
Amoxicilline/acide clavulanique	20/10 μg	≥ 19	< 19
Imipenème	10 μg	≥ 22	< 16
Cefepime	30 μg	≥ 24	< 21
Ceftriaxone	30 μg	≥ 23	< 20
Cefotaxime	30 μg	≥ 20	< 17
Ceftazidime	30 μg	≥ 22	< 19

2.5. Principe de la détection des classes de BLSE

- Détection de BLSE de classe A : La technique de rapprochement des disques (RDD) permet de mettre en évidence une synergie entre un inhibiteur de bêtalactamase et une céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G). En effet les BLSE de classe A sont des pénicillinases de type sérine protéases, inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Ainsi une inhibition de l'enzyme par l'acide clavulanique entraîne une inhibition de la croissance bactérienne par les disques de C3G traduisant l'image de synergie en forme de « bouchon de champagne ».
- Détection de BLSE de classe B (métallo-bêtalactamase) : Elle est réalisée selon la méthode de Dongeun Yong et al. en utilisant une solution stérilisée par autoclave d'EDTA à 0,5 M pH 7 [44]. Les BLSE de classe B sont des métallo-enzymes, dont le site actif contient un ion zinc essentiel à leur activité, d'où l'effet inhibiteur d'agents chélateurs de cations divalents comme l'EDTA. Ainsi une inhibition de l'enzyme par l'EDTA permet de restaurer l'activité bactéricide de l'imipenème qui se traduit par une zone d'inhibition supérieure ou égale à 22 mm.

2.6. Interprétation des résultats

Les BLSE de classe A sont inhibées par l'acide clavulanique, observant ainsi à l'antibiogramme l'image de « bouchon de champagne » après rapprochement des disques (**Figure 5**). Les boîtes sur lesquelles cette image est observée représente des souches sécrétrices d'une BLSE de classe A.

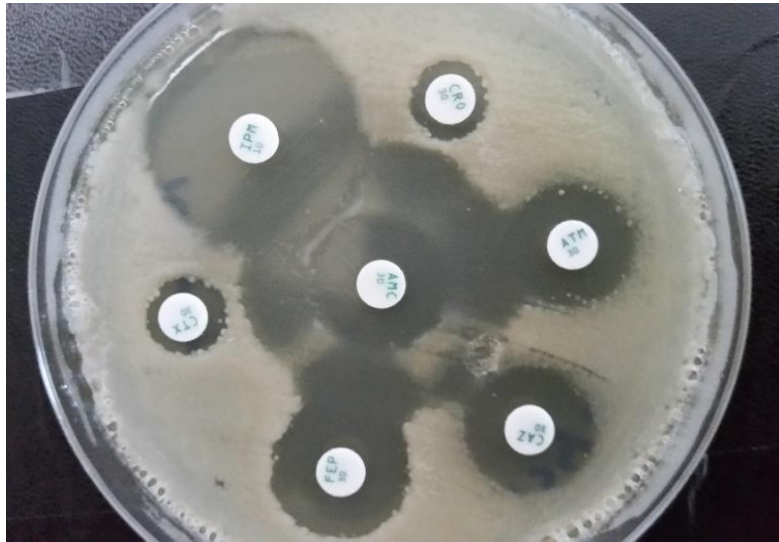


Figure 5 : Image de « bouchon de campagne ».

Les BLSE de classe B sont inhibées par l'EDTA, restaurant ainsi l'activité de l'imipénème (**Figure 6**). Les boîtes sur les quelles la différence de diamètre entre les zones d'inhibition des disques est observée représente des souches sécrétrices d'une BLSE de classe B.

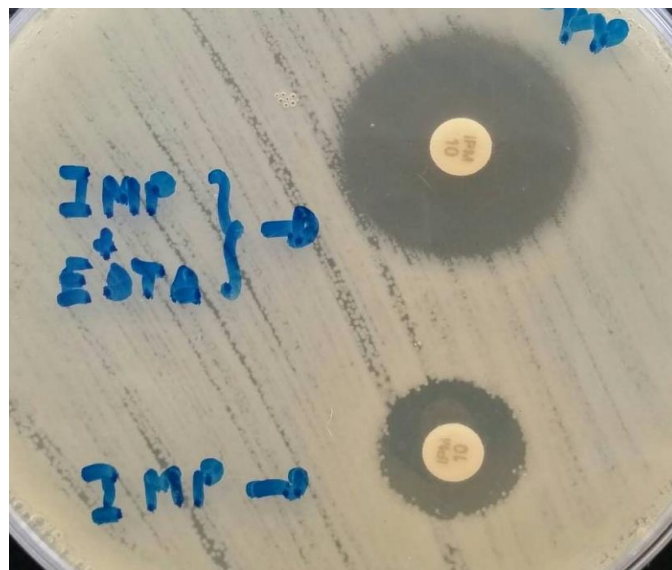


Figure 6 : Mise en évidence d'une bêta lactamase de classe B.

III. RESULTATS

1. Répartition des souches selon le sexe

Notre échantillonnage était constitué de 50 souches isolées de prélèvements venant de patients de sexe masculin dans 54% des cas (n=27) et de sexe féminin dans 46% (n=23) soit un sex ratio de 1,17 (**Figure 7**).

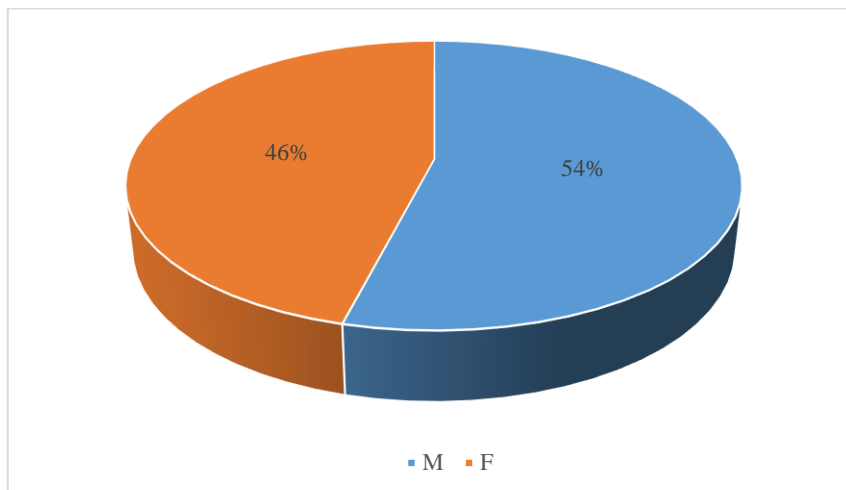


Figure 7 : Répartition des souches selon le sexe.

2. Répartition des souches selon l'âge

Les souches étaient isolées de patients âgés de 10 à 82 ans avec une moyenne de 35 ans. Les tranches d'âges les plus représentées étaient 20 à 30 ans, 40 à 50 ans et 60 à 70 ans. Notre échantillonnage ne comportait pas d'enfants de moins de 10 ans (**Figure 8**).

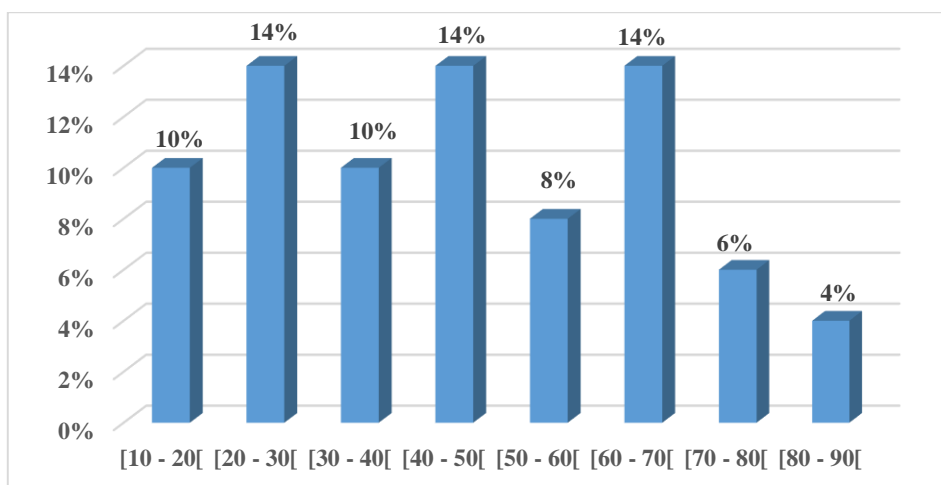


Figure 8 : Répartition des souches selon la classe d'âge

3. Répartition des souches selon l'origine des prélèvements

Notre échantillonnage était représenté par des isolats venant de patients externes soit 30%(N=15). Pour les souches venant des patients hospitalisés, le service le plus représenté était le service de neurologie avec 20%(N=10), s'en suit le service des maladies infectieuses et tropicale 22%(N=11) (**Figure 9**).

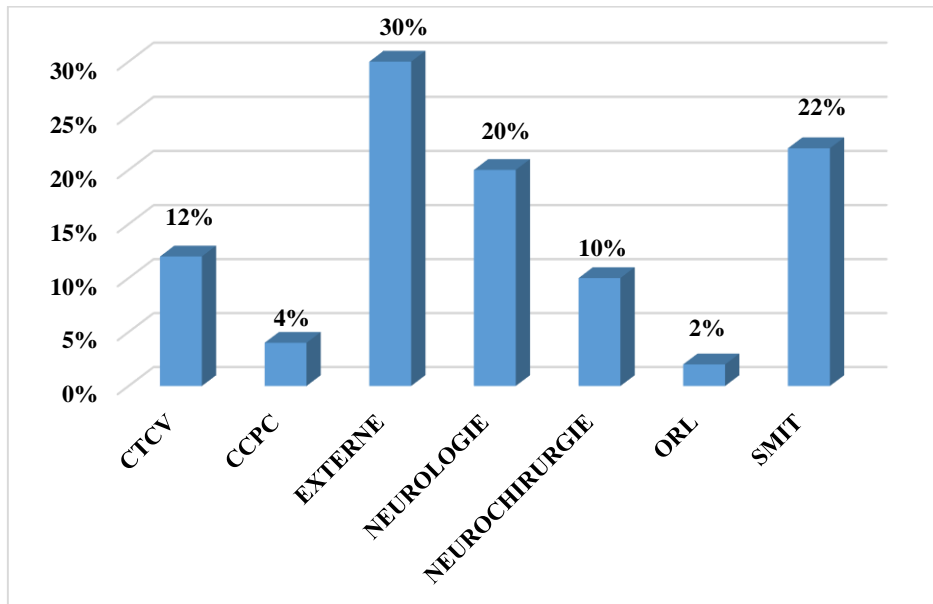


Figure 9 : Répartition des souches selon l'origine des prélèvements

4. Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Les prélèvements d'urines étaient plus représentatifs de notre échantillonnage avec 48%(N=24), puis suivent les prélèvements de pus soit 32%(N=16) (**Figure 10**).

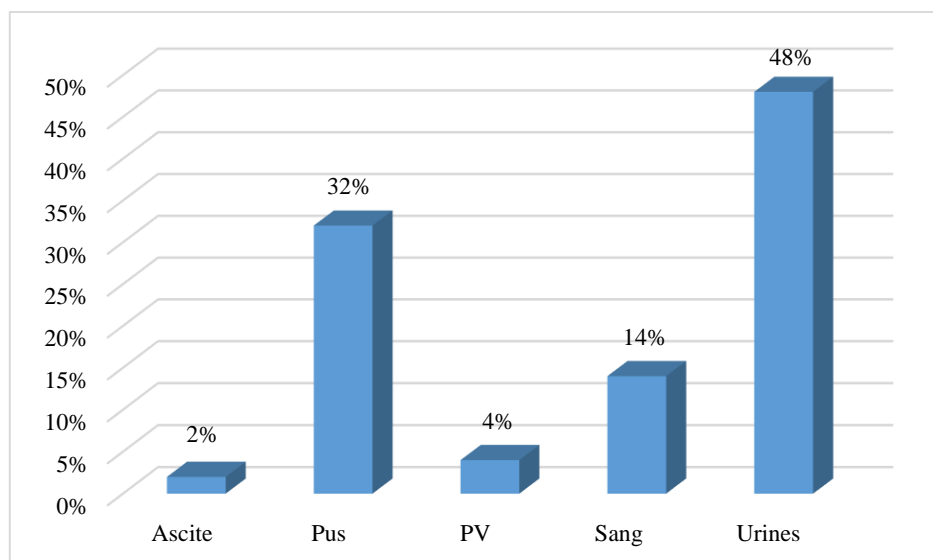


Figure 10 : Répartition des souches selon la nature du prélèvement.

5. Répartition des souches selon l'espèce

L'essentiel des souches d'entérobactéries était représenté par *Enterobacter spp* soit 40%(N=20) suivi d'*Escherichia coli* 32%(N=16), de *Klebsiella pneumoniae* 24%(N=12) et *Klebsiella oxytoca* représentait le plus faible pourcentage 4%(N=2) (**Figure 11**).

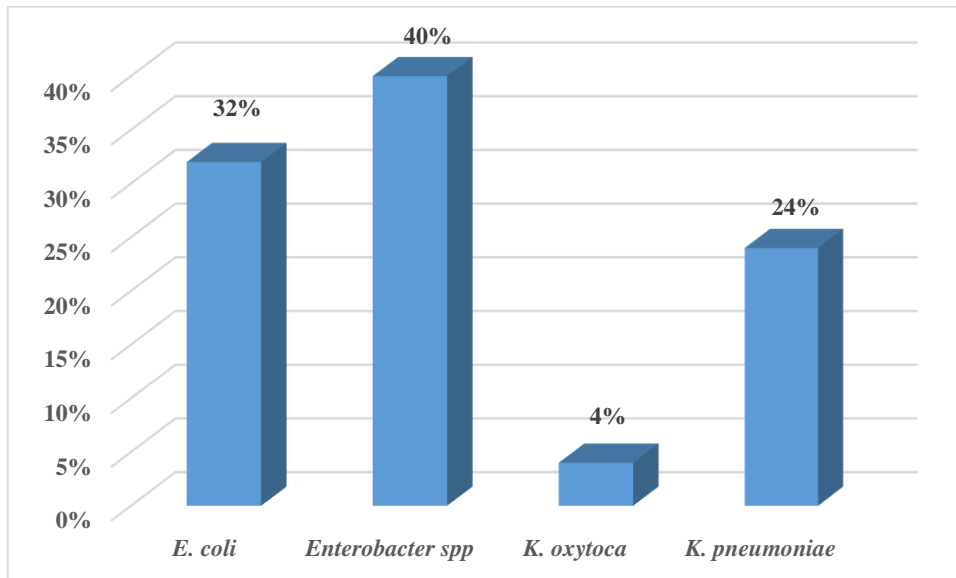


Figure 11 : Répartition des souches selon l'espèce.

6. Répartition des souches selon la classe de bêta-lactamases.

56%(N=28) de nos souches produisaient une BLSE de classe A avec l'image caractéristique de « bouchon de champagne » et 14%(N=8) une BLSE de classe B (**Figure 12**).

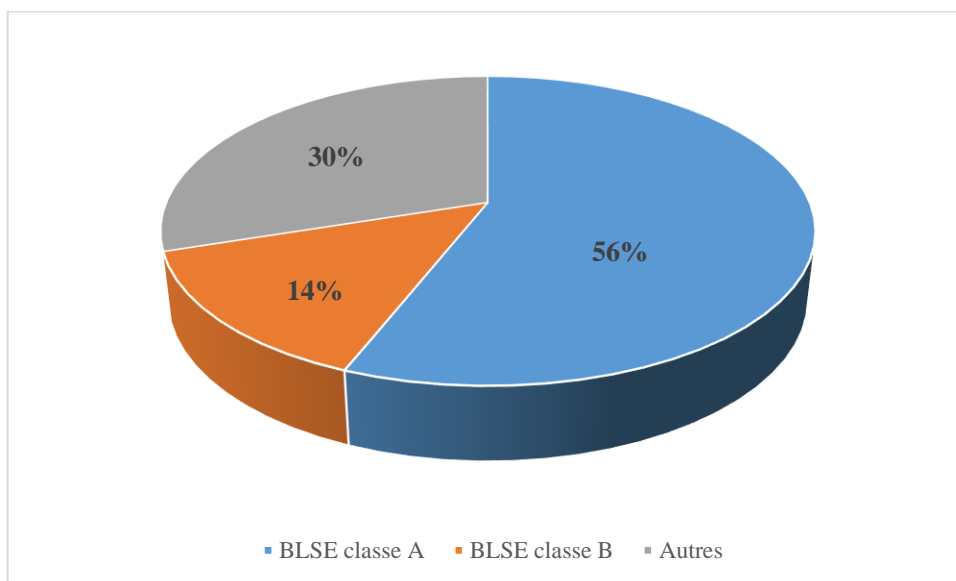


Figure 12 : Répartition des souches selon la classe de bêta-lactamases.

7. Répartition des espèces d'entérobactéries selon la classe de bêtalactamases

Enterobacter spp était l'espèce la plus représentée avec 12 souches qui produisaient une BLSE de classe A et 5 souches une BLSE de classe B (**Tableau 6**).

Tableau VI : Nombre d'espèces d'entérobactéries selon la classe de bêtalactamases.

Souches	Classe de BLSE			Total
	A	B	Autres	
<i>K. oxytoca</i>	2	0	0	2
<i>K.pneumoniae</i>	6	1	5	12
<i>E. coli</i>	8	1	7	16
<i>Enterobacter spp</i>	12	5	3	20
Total				50

8. Répartition des classes de bêtalactamases selon la provenance.

Les isolats reçus à titre externes montraient : 6 souches sécrétrices de BLSE de classe A et 2 souches sécrétrices de BLSE de classe B.

Au service des maladies infectieuses (SMIT), 9 souches étaient sécrétrices de BLSE de classe A et aucune souche ne sécrétait une BLSE de classe B (**tableau 7**).

Tableau VII : Répartition des classes de bêtalactamases selon la provenance.

Service	Classe de BLSE			Total
	A	B	Autres	
Externe	6	2	7	15
SMIT	9	0	2	11
Neurologie	5	2	3	10
CTCV	5	0	1	6
Neurochirurgie	1	2	2	5
Chirurgie Cardiopédiatrique	2	0	0	2
ORL	0	1	0	1
Total				50



DISCUSSION

Il s'agissait d'une étude prospective réalisée au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU Fann. Ce travail s'était déroulé en 2017 allant du 01 Janvier au 31 décembre et a porté sur 50 souches d'entérobactéries isolées et identifiées au laboratoire à partir de prélèvements à visée diagnostique. Toutes les souches sélectionnées étaient sécrétrices de bêtalactamases à spectre élargi.

L'âge moyen des patients était de 35 ans avec des extrêmes allant de 10 à 82 ans. Le sexe masculin était plus représenté avec 54% et le sexe féminin 46% avec un sex ratio de 1,17. En 2015, une étude menée au CHU Aristide Le Dantec sur les profils phénotypiques de résistance aux carbapénèmes de souches productrices de bêtalactamases à Spectre Elargi avait trouvé que 2/3 de la population avait une tranche d'âge de 10 à 30 ans, les hommes étaient plus représentés que les femmes avec un sex ratio de 1,63 [45].

L'âge des patients dans notre étude et l'isolement d'EBLSE chez ces patients n'avait pas de relation probante.

Les souches isolées de notre étude provenaient de divers prélèvements. La majorité était isolée des urines (48%) suivi des prélèvements de pus (32%), la même répartition était retrouvée dans une autre étude faite dans un hôpital à Dakar avec 53% des souches isolées des urines et 20% de pus [45]. Cette distribution est habituelle dans un laboratoire de bactériologie car l'ECBU constitue l'examen le plus fréquemment demandé.

La détection phénotypique d'entérobactéries productrices de BLSE de notre étude par la méthode de rapprochement des disques avait révélé que 56% des BLSE étaient de classe A et 14% de classe B (MBL) correspondant à des carbapénèmases. Parmi ces carbapénèmases 5 souches soit 10% étaient isolées de patients hospitalisés. La production de carbapénèmases concernait 23% des souches dans l'étude de Diouf O.K. et coll, mais l'échantillonnage était plus important.

Enterobacter spp produisait 10% des BLSE de classe B (carbapénèmases) et 24% de BLSE des classe A. Les BLSE de classe A étaient surtout isolées chez les patients hospitalisés notamment au service des maladies infectieuses (SMIT) 18%, en neurologie 10% et au service de chirurgie thoracique cardio-vasculaire (CTCV) 10%. Les souches productrices de carbapénèmases étaient isolées de produits pathologiques provenant du service de neurologie et de neurochirurgie avec 4% dans chacun des services. Dans une autre étude menée aussi à Dakar en 2015 [45], les souches produisant une carbapénèmase (classe B) représentaient 23% parmi

les quelles *Klebsiella pneumoniae* était la souche qui produisait le plus de carbapénèmase soit 25,8%.

Le profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénèmases peut varier d'un pays à l'autre. En France, au niveau communautaire, la proportion d'infections à EBLSE est moins importante ; en 2006 la fréquence des entérobactéries isolées de prélèvements en communauté a visée diagnostique et productrices de BLSE était de 1,1 %. Parmi elles, 34 % étaient productrices de BLSE de classe A type CTX-M-15 [46]. Cette proportion est en augmentation puisqu'en 1999, cette prévalence était estimée à 0,3 % [47].

Cette prévalence était estimée à 6,05% au Maroc en 2014 [48] où *Klebsiella pneumoniae* semblait être la souche productrice potentielle de carbapénèmases, avec une prévalence de 16,40%, suivi d'*Enterobacter cloacae* avec 6,33%. La plupart de ces études ont trouvé une prévalence d'entérobactéries productrices de carbapénèmases supérieure à nos résultats avec *Klebsiella pneumoniae* la souche la plus retrouvée.

Toujours au Maroc en 2010, une étude sur la recherche de carbapénèmases chez *Klebsiella pneumoniae*, avait trouvé 03 souches résistantes aux carbapénèmes sur 211 souches testées. Aujourd'hui la plupart des entérobactéries sont sensibles aux carbapénèmes (Imipénème, értapénème...) donc produisent une BLSE de classe A mais l'inquiétude à l'heure actuelle est représentée par l'émergence des BLSE de classe B entraînant une inefficacité des carbapénèmes.

Dans les pays du Nord, l'évolution de la prévalence des EPC est régulièrement suivie. Ainsi en 2007, il y'avait que des cas sporadiques. En septembre 2008, un cas a été signalé, il s'agissait d'un transfert d'un patient portant *K.pneumoniae* (VIM-1) de la Grèce. Un autre cas a été détecté en juin 2010 d'un autre patient en provenance du Pakistan infecté par *E. coli* (NDM-1). Depuis 2010, on assiste à une émergence rapide d'espèces d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (I/R) et /ou productrices de carbapénèmases [49].

Par ailleurs une étude menée en Turquie avait montré que la plupart des souches de *Klebsiella pneumoniae* produisant une carbapénèmase exprimaient également des bêtalactamases de classe A comme la Sulfhydryl Variable (SHV), la Cefotaximase-Munich (CTX-M) [50]. Dans notre étude la majorité des souches productrices de carbapénèmases étaient retrouvés chez les patients en réanimation et au service des maladies infectieuses et tropicales. Ceci peut s'expliquer par la pression de sélection liée à l'usage intensif des antibiotiques dans la chimio-prophylaxie chez les patients alités.

Jusqu'à la fin des années 1990, les entérobactéries productrices de BLSE étaient principalement des espèces dites « hospitalières », *K. pneumoniae* ou *Enterobacter spp*, productrices d'enzymes de classe A ; type TEM et/ou SHV et diffusant de façon clonale entre patients hospitalisés. Depuis le début des années 2000, l'émergence et la dissémination explosive de « nouvelles » BLSE (type CTX-M) sont observées au niveau mondial, avec un changement radical de l'épidémiologie [3 - 4].

En Amérique latine, les bactéries productrices de KPC sont endémiques dans certains pays tels que la Colombie et l'Argentine [51]. En Europe, on retrouve des bactéries productrices de KPC dans presque tous les pays ; elles sont le plus souvent liées aux importations en provenance de zones endémiques (Grèce et l'Italie) [52]. En Israël, l'endémicité des bactéries productrices de KPC a été démontrée dans de nombreux cas associés aux soins, mais aussi visiblement dans des cas d'infections communautaires [53].

Autre BLSE de classe A fréquemment retrouvé est la CTX-M avec un mécanisme de diffusion plus complexes que ceux des BLSE de classe A type TEM ou SHV, mettant en jeu non seulement une diffusion clonale de bactéries mais aussi une diffusion des enzymes via les plasmides et/ou d'autres éléments génétiques mobiles [54].

L'isolement de MBL (classe B) transférables est, en revanche, de plus en plus fréquent. Il existe de nombreuses variétés de MBL regroupées dans plusieurs familles : VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM.

La bêtalactamase IMP-1 a été isolée pour la première fois au Japon en 1990 sur un plasmide conjugatif chez une souche de *P. aeruginosa* [55], puis a rapidement diffusé chez les entérobactéries et *Acinetobacter baumannii* partout dans le monde [56 – 57].

La bêtalactamase VIM-1 a été isolée pour la première fois en 1997 en Italie à Vérone chez une souche de *P. aeruginosa* [58].

Seules les méthodes moléculaires (PCR +/- séquençage ou hybridation sur puces à ADN) permettent, à l'heure actuelle, de caractériser de façon précise les bêtalactamases produites par les bactéries. Ces méthodes sont réalisées en routine dans certains laboratoires cliniques spécialisés, pour pallier aux problèmes de la détection phénotypique des micro-organismes producteurs de BLSE. Des kits commerciaux existent et permettent la détection des gènes codant les carbapénèmases, y compris directement à partir des échantillons cliniques [59 – 60 - 61].



CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La résistance aux carbapénèmes des entérobactéries, en particulier par production de carbapénèmases transmissibles, est un problème majeur de santé publique. En effet, les infections à bactéries productrices de carbapénèmases entraînent de véritables situations d'impasse thérapeutique [62 - 63]. Aujourd'hui, la prévalence de la résistance enzymatique aux carbapénèmes chez les entérobactéries reste encore faible. Au Sénégal, elle commence à apparaître bien que la disponibilité des carbapénèmes notamment de l'imipénème soit relativement récente.

Il convient évidemment de tout mettre en œuvre pour que cette situation reste la plus immuable possible. Pour cela, les stratégies de dépistage et de maîtrise de la diffusion doivent être appliquées rigoureusement. Il convient également de limiter au maximum la pression de sélection et donc de maîtriser la prescription des carbapénèmes, grâce à la rédaction et la mise en œuvre de recommandations d'une part, et à la présence de référents antibiotiques dans les hôpitaux, d'autre part [64]. Les carbapénèmes sont des molécules indispensables pour le traitement des infections à germes producteurs de BLSE, surtout dans le contexte actuel de diffusion massive des BLSE de classe A ; type CTX-M, mais ce sont des antibiotiques qu'il est nécessaire de préserver notamment pour lutter contre les souches productrices de BLSE de classe B. Ce d'autant qu'il n'existe actuellement pas de perspective proche de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques.

Les recommandations passent par une détection et une caractérisation des BLSE qui constitue un enjeu important en microbiologie puisqu'elle est très difficile avec les méthodes couramment utilisées en routine et demande donc une grande vigilance.

Les méthodes phénotypiques (antibiogramme, CMI etc...) peuvent permettre entre autre d'identifier les souches productrices de BLSE. La positivité de ces tests doit faire rechercher le gène codant pour ces BLSE par PCR. A cet effet, il est souhaitable que le laboratoire de microbiologie soit doté d'une unité de biologie moléculaire fonctionnelle, pour pallier aux problèmes de la détection phénotypique des souches productrices de BLSE de classe A et B, mais aussi maîtriser la diffusion clonale des gènes de résistances entre espèces bactériennes.

Il est également important de formuler des recommandations à l'endroit des cliniciens, biologistes et du personnel soignant :

- Eviter l'antibiothérapie probabiliste dans le traitement des infections.
- Eviter l'usage abusif des antibiotiques et la mauvaise observance chez les patients.
- Identifier les bactéries multirésistantes, signalé et désinfecter les services où ces bactéries circulent
- Isoler les patients porteurs de BMR.
- Le lavage antiseptique (hygiénique) des mains après contact avec le patient porteur.
- Le port de gants à usage unique non stériles lors de tous les contacts particulièrement contaminants avec le patient porteur, et dans certains cas, avec son environnement immédiat. Ils doivent être ôtés dans la chambre. L'utilisation de gants ne dispense en aucun cas du lavage des mains après le contact.
- Le port de tablier lors de soins particulièrement contaminants ou exposant à un contact large avec le patient.
- L'utilisation de matériel de soins réservé à chaque patient porteur de BMR (matériel de toilette, tensiomètre, stéthoscope, petit matériel de soin...).
- La gestion rigoureuse des déchets qui doivent être gardés dans la chambre jusqu'à leur évacuation rapide selon la filière réglementaire habituelle.
- Le traitement adéquat (incinération) des excréta et déchets de patients infectés ou colonisés.

Enfin, les BLSE constituent un problème de santé publique et imposent une surveillance épidémiologique pour l'obtention d'indicateurs pertinents et adaptés, destinés au séquençage génomique des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi.

PERSPECTIVES

La caractérisation phénotypique des classes de bêtalactamases a permis d'avoir des résultats préliminaires. La sélection des souches d'entérobactéries doit être réalisée en utilisant les méthodes codifiées. La confirmation des phénotypes de bêtalactamases par la biologie moléculaire en recherchant les gènes de résistance est indispensable. Ces gènes sont portés souvent par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, intégrons, transposon ou cassettes.

Ainsi, nous voulons dans le cadre d'un travail de PhD, procéder à la confirmation génotypique des différentes classes de bêtalactamase passant par :

- Etendre l'étude à un échantillon plus important de différentes structures et de différentes régions ce qui pourra permettre d'évaluer d'avantage l'émergence de ces bêtalactamases.
- Poursuivre la caractérisation phénotypique en utilisant le disque d'ertapénème : En effet ce disque possède la meilleure sensibilité pour la détection des entérobactéries productrice de carbapénèmase (EPC).
- Sélectionner des souches en utilisant le Carba NP test ou le test de Hodge modifié.
- Détecter sur le plan phénotypique et génotypique les autres types et classe de bêtalactamases (classe C et D).
- Etablir un profil épidémiologique grâce au génotypage permettant ainsi de voir les classes et types de bêtalactamases chez les entérobactéries isolées au laboratoire, à Dakar voire même au Sénégal.



REFERENCES

1. **Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.** Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315 - 7.
2. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 657—86.
3. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al.** CTX-M changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165 - 74.
4. **Canton R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466 - 75.
5. **Denis F., Dabernath, Monteil H. Avril J. L.** Bactériologie clinique *Edition marketing*, Paris, 1998 ; 144-145.
6. **Farmer** Biochemical identification of new species and biogroup of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens *J. clin. Microbiol.*, 1985, 21 : 46-76.
7. **Le Minor L., Veron N.** Bactériologie Médicale Flam Med. Science, Paris, 1989 : 333-318 ; 773-823
8. **Edwards P.R., Ewing W.H.** Identification of the Enterobacteriaceae Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed, 1977.
9. **Farmer P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfatter, Tenover F.C. and R.H. Tenover** (eds) 7th ed. *Enterobacteriaceae : Introduction and identification* In : *Manual of clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington DC, 1999 : 442-458.
10. **Niang O.** Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires Thèse Pharm., Dakar 2003, n° 60.
11. **Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues R.** Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA, Paris, 1987 : 121-137 ; 146-155.
12. **Drame B.** Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. Thèse Pharm., Dakar, 2001 ; n° 86.

13. **Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ.** Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim. Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(5):1018–29.
14. **Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN.** Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–1999). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42(3):193–8.
15. **Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gür D, et al.** *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveill* 2011;16(11).
16. **Ruppé E, Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, et al.** Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(7):3135–7.
17. **Bakhoun I.** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. *Thèse Pharm.*, 2004. n° 8.
18. **Bossert I. D., Young L.Y.** Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology*, 1986, 52 (5) : 1117-1122.
19. **Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N., Balbastre C.** Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne Doins, Paris, 2e ed 1979 : 109-187
20. **Le Minor L, Veron M.** Bactériologie médicale. 2ème éd. Médecine Science Flammarion, Paris, 1990; 389-472.
21. **Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H.** Bactériologie clinique, Ellipses, Paris, 2000, 2^{ème} édition : 171-77.
22. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.** Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2385-92

23. **Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315—7.
24. **Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE et al.** Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI/II plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 2008 ; (sous presse).
25. **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289:321 - 31.
26. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211 - 33.
27. **Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al.** Redefining extended-spectrum betalactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1 - 4.
28. **Gniadkowski M.** Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:11-32
29. **Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-91
30. **Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM.** Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:144-153
31. **Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L.** Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:52-9
32. **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:75-81
33. **Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:42-52

- 34. Bradford PA.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51
- 35. Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-86
- 36. Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14
- 37. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74
- 38. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C.** The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):33-41.
- 39. Cantón R, Coque TM.** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466-75
- 40. Livermore DM.** Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:3-10
- 41. Garnier B et Jarlier V.** Bêta-lactamines et bacilles à Gram négatif. *Feuillets de biologie*, 1996, XXXVII, (212) :13-20.
- 42. Rolison GN.** Forty of beta-lactam research. *J. Antimicrob Chemother* 1998; 41(6):589-603.
- 43. Poirel L, Naas T, Nordmann P.** Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1):75-81.
- 44. Yong D Lee K, Yum JH, Rossolini GM, Chong Y,** Imipenem EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 :3798-801
- 45. DIOUF O.K.** Profils phénotypiques de résistance aux carbapénèmes de souches productrices de bêtalactamases à Spectre Elargi. Thèse Pharma, Dakar 2015, no 08.

46. **Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al.** Nationwide survey of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(6):1205–14.
47. **Quentin C, Arpin C, Dubois V, André C, Lagrange I, Fischer I, et al.** Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of Enterobacteriaceae in French extra-hospital practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(3):185–93.
48. **Akel Z.** Profils phénotypiques des entérobactéries productrices de carbapénèmases. Thèse Pharma, Rabat 2014, no 75.
49. **Jans B, Huang T-D D, Bogaerts P, Catry B, Glupczynski Y.** Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Belgium, Surveillance data institut scientifique de santé publique January 2012-June 2013.
50. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228-36.
51. **Lee K, Yum JH, Yong D et al.** Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4485-4491
52. **Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al.** Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013;13:785-796.
53. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228-236.
54. **Canton R, Novais A, Valverde A, et al.** Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14Suppl1: 144—53.
55. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147—51
56. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, et al.** A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612—5.

- 57. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306—25.
- 58. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al.** Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584—90.
- 59. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al.** Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16: 112—22.
- 60. Naas T, Cuzon G, Truong H, et al.** Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3086—92.
- 61. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, et al.** Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods* 2010;83:185—7.
- 62. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, et al.** Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 1028—33.
- 63. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, et al.** Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005;192:1606—12.
- 64. Lesprit P, Duong T, Girou E, et al.** Impact of a computer-generated alert system prompting review of antibiotic use in hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2009;63: 1058—63.