

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

**DETECTION DES BACTERIES MULTIRESISTANTES AU
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DU CHU DE
LIMOGES**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 07 Décembre 2012

par

Yassine EDDAYAB

né le 08 Novembre 1986 à Agadir (MAROC)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur S. ROGEZ Présidente

Madame le Docteur N. HIDRI, Praticien hospitalier..... Directrice

Madame S. DELEBASSE, Maître de Conférences..... Juge

Monsieur Y. KHIYATI, Docteur en pharmacie..... Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

**DETECTION DES BACTERIES MULTIREsISTANTES AU
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DU CHU DE
LIMOGES**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 07 Décembre 2012

par

Yassine EDDAYAB

né le 08 Novembre 1986 à Agadir (MAROC)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur S. ROGEZ Présidente

Madame le Docteur N. HIDRI, Praticien hospitalier..... Directrice

Madame S. DELEBASSE, Maître de Conférences..... Juge

Monsieur Y. KHIYATI, Docteur en pharmacie..... Juge



DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

| | |
|----------------------------|--|
| BENEYTOU Jean-Louis | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| BOTINEAU Michel | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE |
| BROSSARD Claude | PHARMACOTECHNIE |
| BUXERAUD Jacques | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| CARDOT Philippe | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| CHULIA Albert | PHARMACOGNOSIE |
| CHULIA Dominique | PHARMACOTECHNIE |
| DELAGE Christiane | CHIMIE GENERALE ET MINERALE |
| DESMOULIERE Alexis | PHYSIOLOGIE |
| DREYFUSS Gilles | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE |
| DUROUX Jean-Luc | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| MAMBU Lengo | PHARMACOGNOSIE |
| LOUDART Nicole | PHARMACOLOGIE |
| ROUSSEAU Annick | BIOSTATISTIQUE |
| VIANA Marylène | PHARMACOTECHNIE |

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| LACHATRE Gérard | TOXICOLOGIE |
| MOESCH Christian | HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT |
| ROGEZ Sylvie | BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE |

MAITRES DE CONFERENCES :

| | |
|------------------------------|--|
| BASLY Jean-Philippe | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| BATTU Serge | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| BEAUBRUN-GIRY Karine | PHARMACOTECHNIE |
| BILLET Fabrice | PHYSIOLOGIE |
| CALLISTE Claude | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| CLEDAT Dominique | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| COMBY Francis | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| COURTIOUX Bertrand | PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE |
| DELEBASSEE Sylvie | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE |
| DEMIOT Claire-Elise | PHARMACOLOGIE |
| FAGNERE Catherine | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| FROISSARD Didier | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE |
| JAMBUT Anne-Catherine | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| LABROUSSE Pascal | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE |
| LEGER David | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |

| | |
|---------------------------------|--|
| LIAGRE Bertrand | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| LOTFI Hayat | TOXICOLOGIE |
| MARION-THORE Sandrine | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| MARRE-FOURNIER Françoise | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| MILLOT Marion | PHARMACOGNOSIE |
| MOREAU Jeanne | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE |
| POUGET Christelle | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| SIMON Alain | CHIMIE GENERALE ET MINERALE |
| TROUILLAS Patrick | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| VIGNOLES Philippe | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |

PROFESSEUR DES LYCEES :

| | |
|--------------------------|---------|
| ROUMIEUX Gwenhaël | ANGLAIS |
|--------------------------|---------|

**ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| IMBERT Laurent | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
|-----------------------|-----------------------------------|

Remerciements

- ❖ **A Madame Sylvie ROGEZ**, Praticien Hospitalier au CHU de Limoges, d'avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie aussi pour le soutien que vous m'avez apporté durant ma 5^{ème} année de pharmacie. Elle m'était très précieuse et je vous en serai toujours très reconnaissant.

- ❖ **A Madame Nadia HIDRI**, praticien hospitalier au CHU de Limoges, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir permis de partager son savoir durant ces trois dernières années. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté. Votre disponibilité et votre implication dans ce travail étaient très rassurantes. Je suis très honoré d'avoir pu travailler avec vous. J'en garderai un très bon souvenir.

- ❖ **A Madame Sylvie DELEBASSE**, Maître de Conférences de Microbiologie-Parasitologie-Immunologie et membre du jury. Je vous remercie d'avoir accepté, et ce sans hésitation, de siéger dans mon jury.

- ❖ **A Monsieur Younès KHIYATI**, Docteur en Pharmacie et membre du jury, d'avoir accepté de juger mon travail. Je vous remercie aussi pour la qualité de votre encadrement durant mon stage officinal.

Je tiens à dédicacer cette thèse à la mémoire de mon papa. Grâce à sa citation préférée: « Relire une page dix fois, permet simplement de comprendre. Il ne reste, ensuite, plus qu'à apprendre », il m'a permis de toujours donner le meilleur de moi-même pour réussir dans la vie. Son courage et ses qualités en tant que père resteront pour moi un exemple.

J'aimerais aussi remercier :

- ❖ ma famille : ma mère et Sanna, ma sœur, sans qui tout ceci ne serait qu'utopie. Vous avez toujours été présentes pour moi, que ce soit dans ma vie professionnelle ou dans ma vie personnelle, et ce malgré la distance qui nous sépare. Je suis très chanceux de vous avoir.
- ❖ L'équipe de la pharmacie du Dr Jouy : Mr Noizat, Younes, Gégé, Sabri, Flo et Arthur, pour leur bonne humeur et leur gentillesse avec lesquels ils m'ont accueilli dans leur « Team » ! Vous le savez déjà mais je ne me lasserai jamais de travailler avec vous.
- ❖ Younou, Cécé et Yanis : Merci pour votre présence et pour tous les moments agréables que nous avons et que nous allons passer ! Mais aussi et bien sur bienvenue au tout nouveau terrien !!
- ❖ Jean louis et Florence : Merci pour votre générosité et votre grand cœur. Je suis très heureux de vous avoir.
- ❖ Khalid : Merci pour tous ces moments de révisions acharnés à la B.U. Toutes excuses étaient bonnes pour boire un café, mais le résultat était là. ! Et merci aussi pour tous les autres moments passés en dehors.
- ❖ Marjo : Merci pour tes relectures assidues et tes conseils précieux. J'imagine la difficulté de te concentrer, notamment, devant un match de tennis. Mais tu m'as permis d'avancer dans mon travail et pour ça je t'en suis très reconnaissant.

- ❖ Ali : Merci pour les corrections et les conseils que tu m'as apportés. Me relire en pleins examens, ne devait pas être une partie de plaisir. Mais, ça m'a été d'une grande aide. Alors merci encore !!

- ❖ Cumin, Thomas, Manou, Maeva, Manu (et Naelys), Marjo, Yannick, Sandra, Mathilde, Aimée : Merci pour tous ces bons moments passés à la fac. J'ai passé, grâce à vous, six superbes années d'études. J'en garderai un très bon souvenir. Et ce n'est pas encore fini ...

- ❖ Macac, Aloua, Khalidamycine, Kamil, Aïmane, Sardine, Bunny, Imane, Le chat, Dj H, Souf, Domino, Ali Dahei, Nega et tous les autres que je n'aurai pas cité : Merci pour votre joie de vivre que vous m'avez transmis. Grâce à vous, mon sourire ne me quitte plus. Je suis content de vous avoir !

SOMMAIRE

Introduction

1^{ère} partie : Structure anatomique bactérienne, les mécanismes d'action des antibiotiques et les principes des mécanismes de résistance des bactéries

- I. Structure bactérienne
 - A. La paroi cellulaire
 - B. Ribosomes
- II. Sites et mode d'action des antibiotiques
 - A. Antibiotiques actifs sur la biosynthèse du peptidoglycane
 - B. Antibiotiques actifs sur les membranes
 - C. Antibiotiques actifs sur la synthèse des acides nucléiques
 - D. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines
- III. La résistance des bactéries aux antibiotiques
 - A. La résistance naturelle
 - B. La résistance acquise

2^{ème} partie : les bactéries multirésistantes

- I. Définition des bactéries multirésistantes (B.M.R)
- II. Les différentes BMR
- III. Evolution et origine de la résistance bactérienne
- IV. Mécanismes de résistances des BMR
 - A. *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)
 - B. *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux Glycopeptides
 - C. Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)
 - D. Les Entérobactéries :
 - E. *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants : PAR
 - F. *Acinetobacter baumannii* multirésistant : ABR

3^{ème} partie : Dépistage et méthodes de détection des BMR au laboratoire du CHU de Limoges

I. Dépistage des BMR

- A. Intérêt du dépistage
- B. Politique de dépistage des BMR
- C. Recommandations pour la maîtrise de la diffusion des BMR
- D. Au CHU de Limoges

II. Détection des BMR

- A. Les sites de prélèvement
- B. Milieux sélectifs des BMR
- C. Détection des BMR au laboratoire du CHU de Limoges

4^{ème} partie : Problématique rencontrée au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges

Conclusion

Bibliographie

Annexes

Dictionnaire des abréviations

Introduction

Depuis toujours, les bactéries sont à l'origine de nombreuses infections humaines, certaines mortelles.

Les antibiotiques ont suscité un grand espoir dans le monde de l'infectiologie : la fin des maladies infectieuses était annoncée !!

Mais le monde bactérien a su s'adapter à l'utilisation, souvent excessive et quelquefois irraisonnée des antibiotiques, phénomène décrit par « pression de sélection des antibiotiques ».

L'apparition de bactéries multi-résistantes, entraînant des échecs thérapeutiques, menace d'inefficacité l'histoire future des antibiotiques, d'autant plus que l'industrie pharmaceutique peine à commercialiser de nouvelles classes d'antibiotiques.

La diffusion de ces souches multi-résistantes est actuellement mondiale avec les mouvements de population. Ceci a amené les pouvoirs publics français à une campagne de sensibilisation dont le slogan était « Les antibiotiques, ce n'est pas automatique ».

La détection des bactéries multirésistantes peut être difficile, parce qu'elle demande une certaine expertise du microbiologiste, et que l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance oblige à une évolution des méthodes de détection, aussi bien manuelles qu'automatisées.

Cette thèse va essayer d'illustrer ces thématiques, en exposant les mécanismes d'action des antibiotiques, les différentes catégories de bactéries multirésistantes, les méthodes de dépistage utilisées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Limoges, et l'exemple d'une difficulté de caractérisation de phénotypes de bactéries multirésistantes.

Première partie

Rappels sur l'anatomie bactérienne, les mécanismes d'action des antibiotiques et les principes des mécanismes de résistance des bactéries

I. Structure bactérienne (schéma 1)

Une bactérie est composée de :

- un nucléoïde (contenant des filaments d'ADN),
- un cytoplasme,
- ribosomes,
- d'une enveloppe cellulaire (composée d'une membrane plasmique, d'une paroi et quelques fois d'une capsule),
- flagelles,
- pili communs et/ou sexuels,
- plasmides. [18]

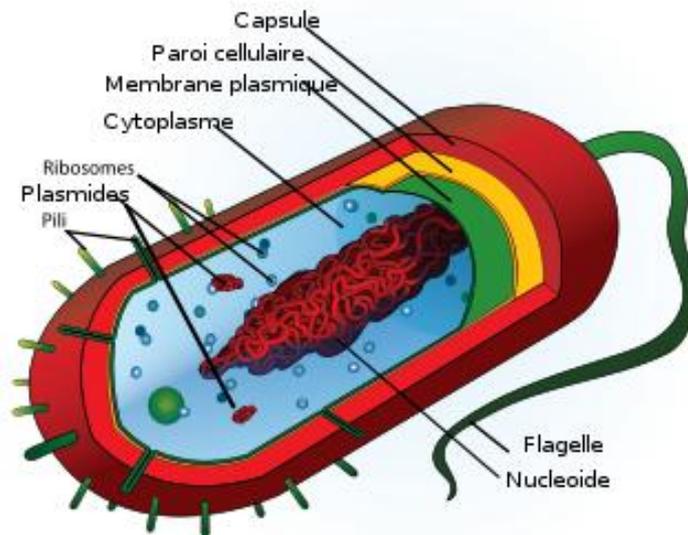


Schéma 1 : Représentation schématique d'une bactérie

La connaissance de la composition et de la fonction de la paroi bactérienne et des ribosomes permettent d'apprécier les mécanismes d'action des antibiotiques.

A. La paroi cellulaire (schéma 2)

La structure d'une bactérie englobe plusieurs couches différentes. La plus externe des couches correspond à la paroi bactérienne, hormis la capsule lorsqu'elle est présente.

La coloration de Gram met en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, ce qui permet de classer les bactéries selon leur morphologie (cocci, bacilles) et leur propriété tinctoriale.

Le principe de cette coloration, selon Gram, repose sur trois étapes :

- une coloration par le violet de Gentiane,
- une décoloration par l'alcool,
- une contre-coloration par la fuchsine (ou la safranine dans la variante de la méthode de Hüscher).

Si les bactéries ont une paroi pauvre en peptidoglycane, perméable à l'alcool, elles seront colorées en rose par la fuchsine (bactéries à Gram négatif). En cas de paroi riche en peptidoglycane, elles resteront colorées en violet (bactéries à Gram positif).

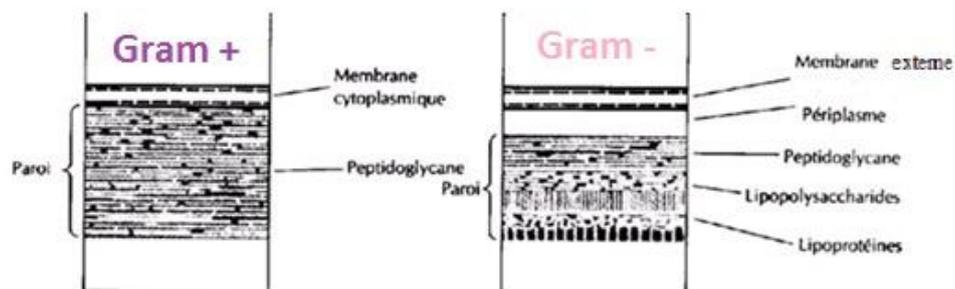


Schéma 2 : Représentation de la paroi des bactéries à Gram + et à Gram -

1. Rôle de la paroi

La paroi assure la forme générale et participe à la protection de la cellule bactérienne. Elle permet le transport des molécules à l'intérieur de la bactérie.

Elle contient aussi une couche de peptidoglycane jouant le rôle de tamis moléculaire, des porines, qui sont des protéines membranaires permettant l'entrée de petites molécules hydrophiles et des acides téichoïques permettant la fixation du peptidoglycane à la membrane bactérienne. [18]

2. Structure du peptidoglycane (schéma 3)

Le peptidoglycane forme un filet à mailles plus ou moins serrées qui entoure la bactérie à la manière d'un « sac ». Ce réseau est composé de chaînes de glycanes reliées entre elles par des chaînons peptidiques.

La partie glycane est constituée de chaînes linéaires où s'alternent la *N*-acétylglucosamine et l'acide *N*-acétylmuramique (ester lactique de la *N*-acétylglucosamine). Ces derniers, sous la forme pyranoside, sont liés par des liaisons bêta-1,4. Les chaînes de longueur variable sont constituées de 20 à 100 résidus de *N*-acétylglucosamine.

Les chaînons peptidiques sont, eux, constitués d'unités térapeptidiques et de ponts interpeptidiques :

- les unités térapeptidiques sont liées à la partie glycane par les *N*-acétylmuramiques,
- les ponts interpeptidiques unissent entre elles les unités térapeptidiques. [18]

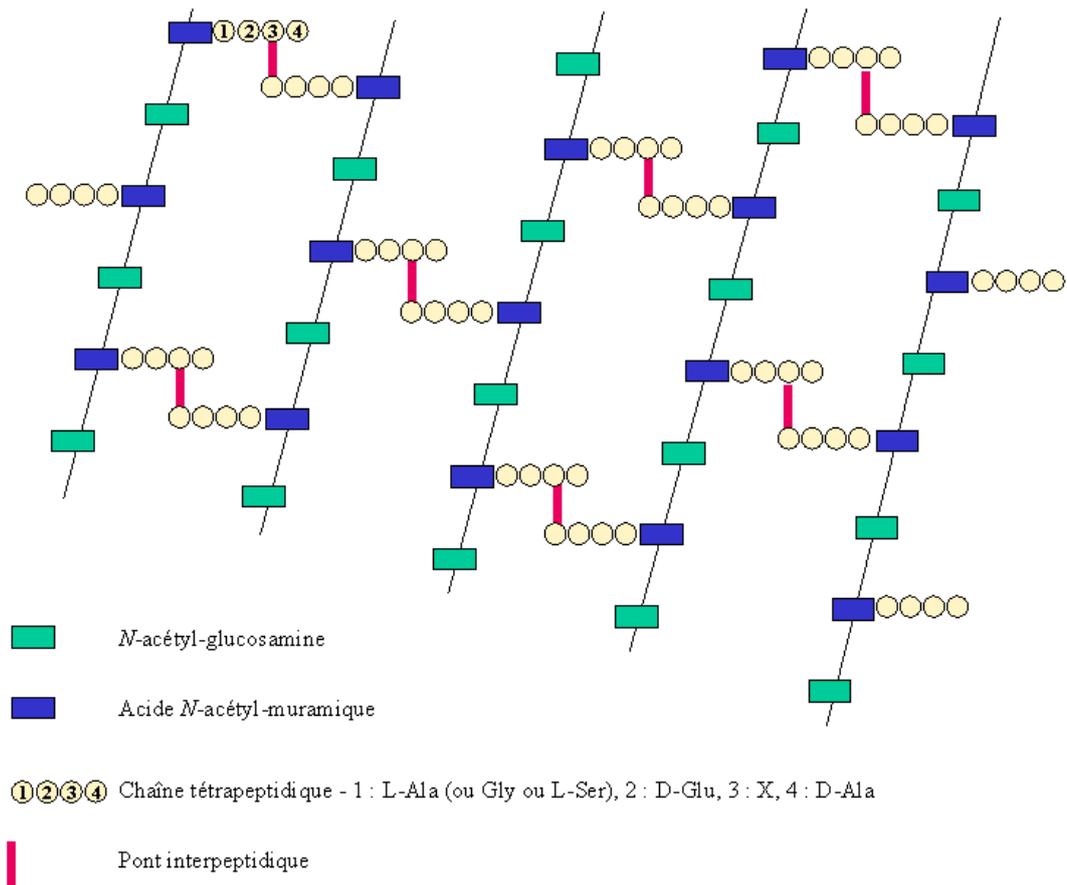


Schéma 3 : Représentation simplifiée du peptidoglycane

3. Biosynthèse du peptidoglycane (schéma 4)

La synthèse du peptidoglycane est complexe et nécessite l'activité d'environ trente enzymes différentes. Elle comporte trois étapes principales.

- Une étape intracytoplasmique aboutissant à la synthèse d'UDP-acétylmuramyl-pentapeptide, terminé par un dipeptide, le D-alanyl-D-alanine. La synthèse de ce dipeptide nécessite l'intervention de la phosphoénolpyruvate transférase, d'une racémase et d'une synthétase.

- Une deuxième étape membranaire aboutit à la formation d'un polymère d'acétylglucosamine et d'UDP-acétylmuramyl-dipeptide. Ce polymère sort du cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique.
- Une troisième étape extracytoplasmique comporte une polymérisation par transpeptidation (liaison peptidique entre acides aminés) et par transglycosylation (liaison glucidique). Ces réactions enzymatiques sont médiées par des carboxypeptidases, des transpeptidases et des transglycosylases. Pour des raisons historiques, elles sont dénommées PLPs ou Protéines Liant les Pénicillines. [18]

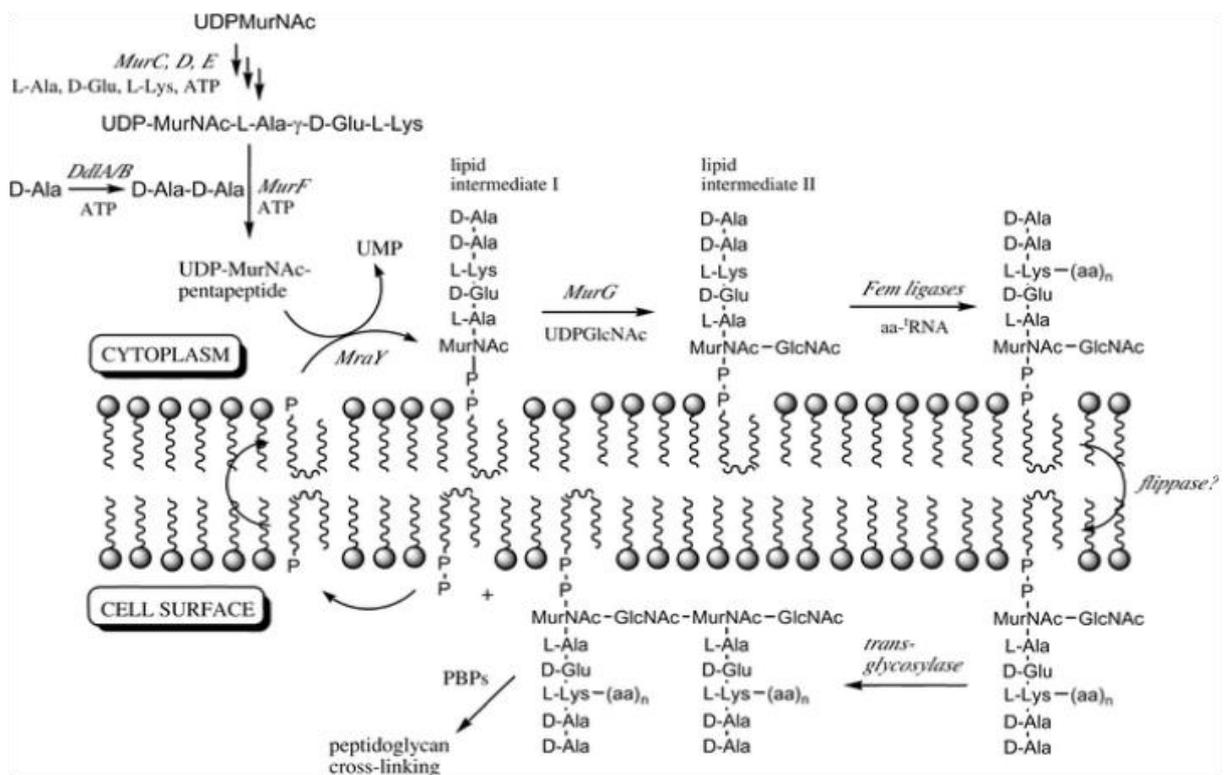


Schéma 4 : Etapes de la biosynthèse du peptidoglycane

B. Ribosomes

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques¹ présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Leur fonction est de synthétiser les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messenger. Ils sont constitués d'ARNs et de protéines ribosomiques.

Leur structure est composée de deux sous-unités, une qui traduit l'ARN messenger (il s'agit de la sous-unité 30S) et une qui se charge de la synthèse de la protéine correspondante (la sous-unité 50S).

II. Sites et mode d'action des antibiotiques

Au XXème siècle, durant la seconde guerre mondiale, est apparu le premier antibiotique : la pénicilline G, découverte par Sir Alexander Fleming². Celle-ci a marqué le début d'une série d'antibiotiques permettant la lutte contre les bactéries.

Un antibiotique est une substance chimique qui a une action inhibitrice spécifique sur les micro-organismes. Cette substance est en théorie dépourvue de toxicité pour les autres types cellulaires comme les cellules eucaryotes.

Ces molécules peuvent avoir une action bactéricide entraînant une diminution de la population bactérienne initiale ou une action bactériostatique avec seulement une inhibition du développement bactérien.

Plusieurs origines, pour les antibiotiques, sont décrites :

- biologique : ils sont issus du monde microbien (bactéries et champignons).
- semi-synthétique : d'origine biologique, ils ont été modifiés par l'industrie pharmaceutique pour améliorer leurs propriétés.

Pour ces deux premières catégories, des mécanismes de résistance sont préexistants, les progéniteurs microbiens devant être résistants à l'action de ces substances.

- synthétique : ils n'ont aucun équivalent dans la nature.

Exemple des Quinolones, issues de la recherche sur les antipaludéens, et du Linézolide.

¹ Complexes ribonucléoprotéines : structure du ribosome composé de protéines et d'ARN

² Sir Alexander Fleming (1881, Lochfield – 1955 Londres) : biologiste et pharmacologue

Quatre grands modes d'action des antibiotiques sont distingués : [2] [16] [24]

- une action sur la biosynthèse du peptidoglycane,
- une action sur la membrane cytoplasmique,
- une action sur la synthèse nucléique,
- une action sur la synthèse protéique.

A. Antibiotiques actifs sur la biosynthèse du peptidoglycane (schéma 5)

Les antibiotiques interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane n'auront aucune action sur les bactéries naturellement dépourvues de paroi (exemple des mycoplasmes).

Sont concernés la bacitracine, la fosfomycine, les β -lactamines, et les glycopeptides.

Quelques exemples de molécules et de spécialités commercialisées en France sont répertoriés en annexe 1, 2 et 8.

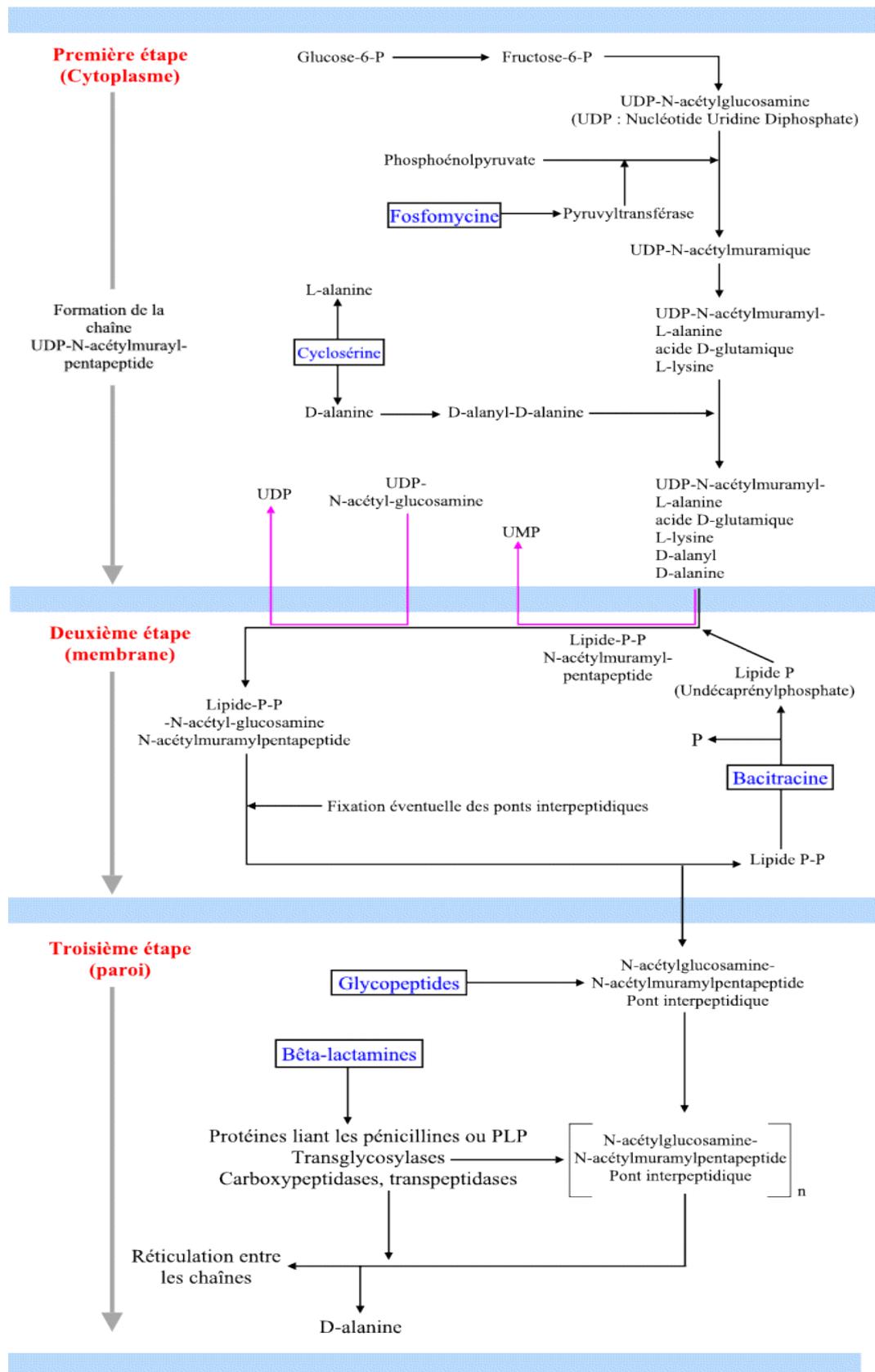


Schéma 5 : Sites d'action des antibiotiques lors de la synthèse de la paroi

1. La bacitracine

La bacitracine est active uniquement sur les bactéries à Gram positif puisque la membrane externe des bactéries à Gram négatif est imperméable à cette molécule. Elle empêche le recyclage du bactoprénol¹ par fixation sur le lipide transporteur.

2. La fosfomycine

La fosfomycine (ou phosphomycine) agit sur la pyruvyltransférase, impliquée dans l'une des premières réactions de la synthèse du peptidoglycane. Cette étape étant intracytoplasmique, la pénétration de la fosfomycine à l'intérieur de la bactérie est nécessaire à son activité (via des systèmes de transport).

Son spectre d'activité antibactérien est large. Son action est bactéricide.

3. Les β -lactamines

Cette famille a pour structure commune le cycle β -lactame (schéma 6).

¹ Bactoprénol : permet le transfert du pentapeptide du cytoplasme vers la paroi bactérienne lors de la synthèse du peptidoglycane. Il est aussi appelé l'undécaprényle

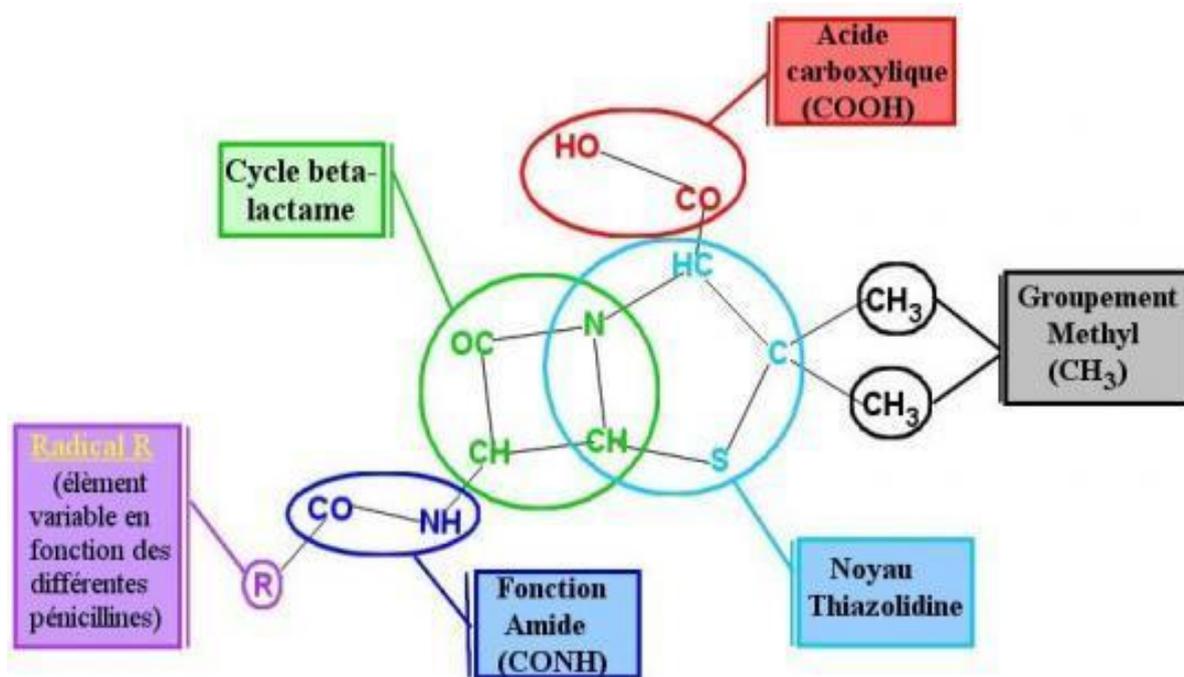


Schéma 6 : Structure des β-lactamines

Les β-lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en se substituant au dipeptide D-alanyl-D-alanine par analogie structurale.

Elles inhibent les PLPs et ont une action bactéricide.

La Pénicilline G est l'ancêtre historique de cette famille qui comporte plus de 50 spécialités.

Cinq groupes sont décrits : les pénames, les pénèmes, les oxapénames, les céphèmes et les monobactames (schéma 7).

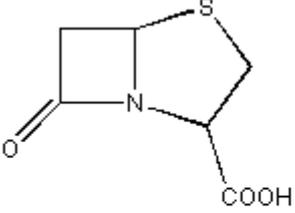
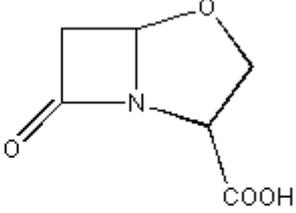
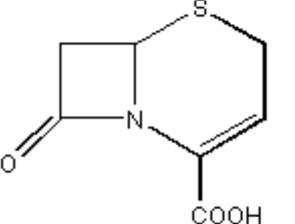
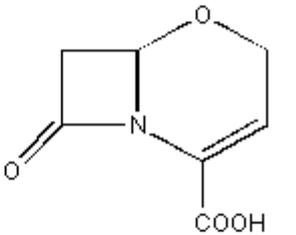
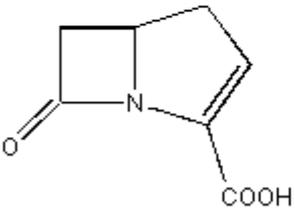
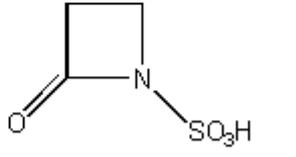
| | |
|--|--|
|  <p>Noyau pénème (Pénicillines)</p> |  <p>Noyau clavame (inhibiteurs de beta-lactamases)</p> |
|  <p>Noyau céphème (céphalosporines)</p> |  <p>Oxacéphème</p> |
|  <p>Carbapénème</p> |  <p>Monobactame</p> |

Schéma 7 : Différences structurales des différents groupes de β -lactamines

a) Pénames

La première molécule décrite, la Pénicilline G, appartient à cette famille.

Ce groupe d'antibiotique se subdivise en plusieurs sous groupes détaillés en annexe 1.

b) Céphèmes

Il s'agit des céphalosporines. Ces dernières sont classées en générations selon leur date de commercialisation et leur activité antibactérienne (annexe 2). Il existe, aujourd'hui, trois générations reconnues de céphalosporines mais le Céfépime est rangé dans une 4^{ème} génération par certains microbiologistes.

c) Carbapénèmes, oxapénames et monobactames

Les carbapénèmes ont le spectre le plus large parmi les β -lactamines. Des exemples de spécialités sont cités en annexe 3.

4. Les glycopeptides

Deux molécules sont comprises dans ce groupe : la vancomycine et la teicoplanine (annexe 8).

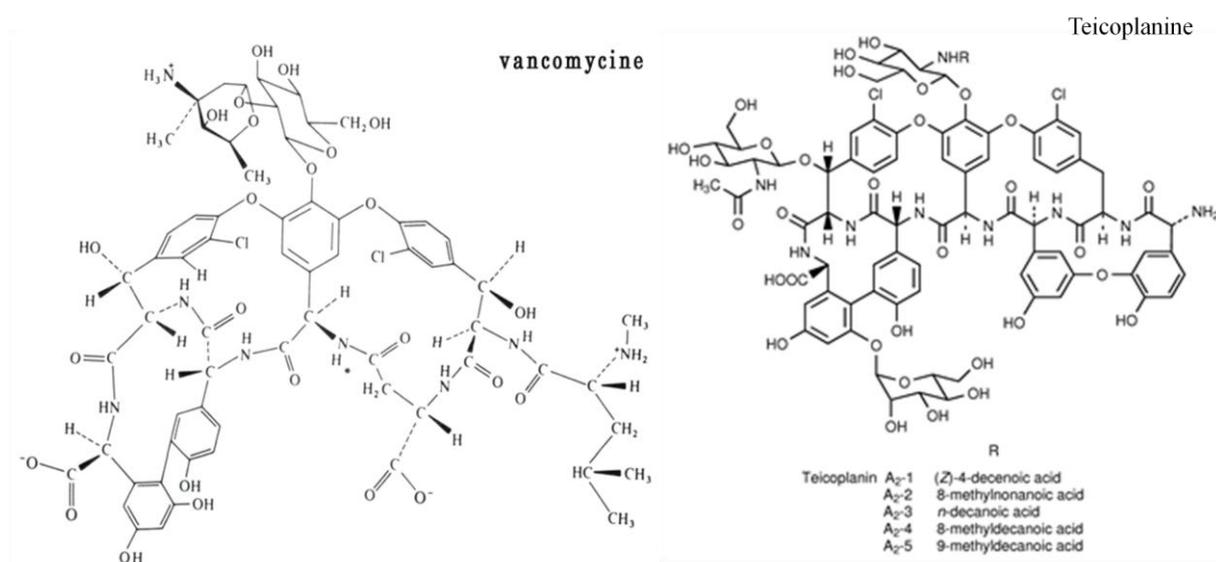


Schéma 8 : Structure des glycopeptides

Elles ont une affinité pour les précurseurs du peptidoglycane comportant le dipeptide D-alanyl-D-alanine. La fixation à ces précurseurs empêche l'allongement des chaînes polysaccharidiques lors de l'étape de transglycosylation par encombrement stérique¹ (schéma 9).

¹ Encombrement stérique : le volume occupé par les glycopeptides gêne les précurseurs du peptidoglycane

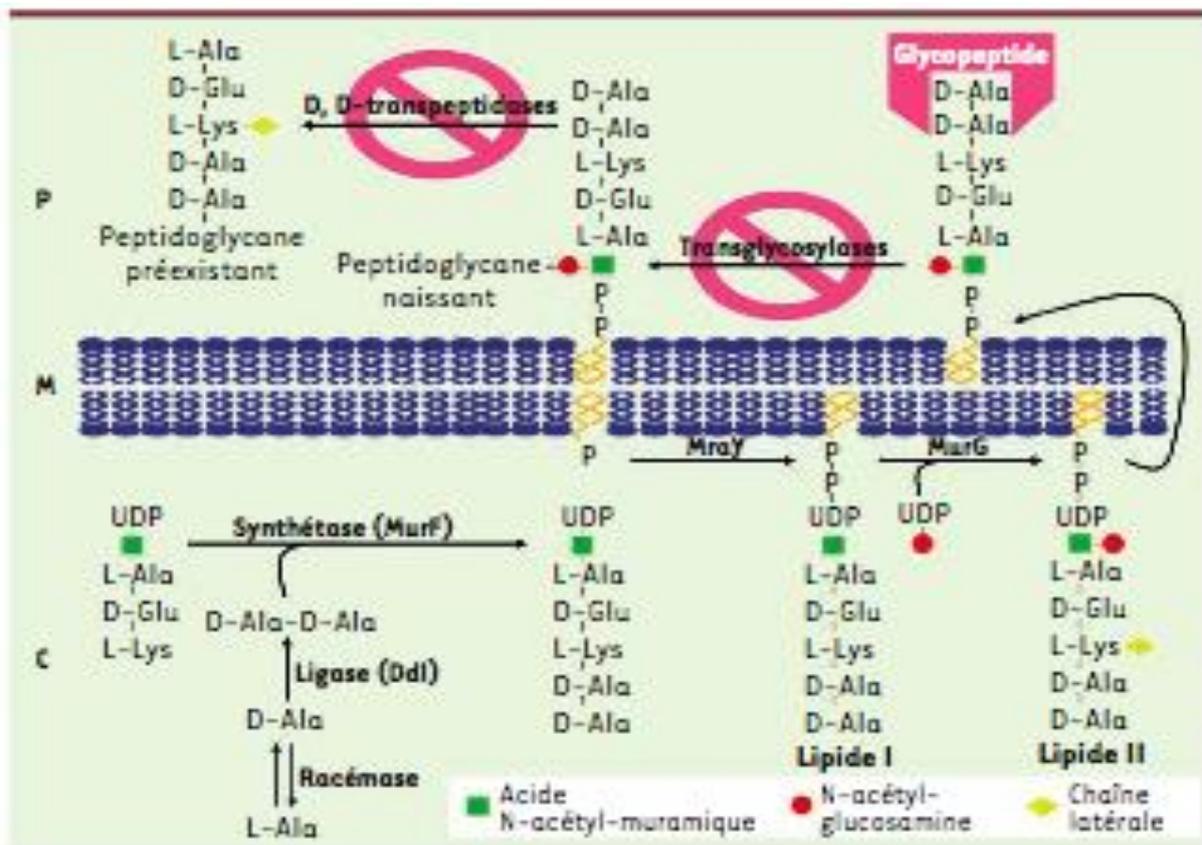


Schéma 9 : Mode d'action des glycopeptides [8]

Leur spectre d'activité ne concerne que les bactéries à Gram positif car leur taille importante ne leur permet pas de franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

B. Antibiotiques actifs sur les membranes

En raison de la similitude entre les membranes bactériennes et celles des cellules eucaryotes, seul un nombre restreint de molécules antibiotiques, dans cette catégorie, a trouvé une utilisation en thérapeutique humaine.

Deux groupes sont distingués : les polymyxines et les lipopeptides.

1. Les polymyxines

Les polymyxines sont constituées d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras. Ces molécules pénètrent à l'intérieur de la membrane par leur extrémité hydrophobe et s'incorporent à la couche de phospholipides de la membrane alors que l'extrémité hydrophile reste orientée vers l'extérieur. Il en résulte une désorganisation de la structure membranaire, ce qui provoque la mort de la cellule.

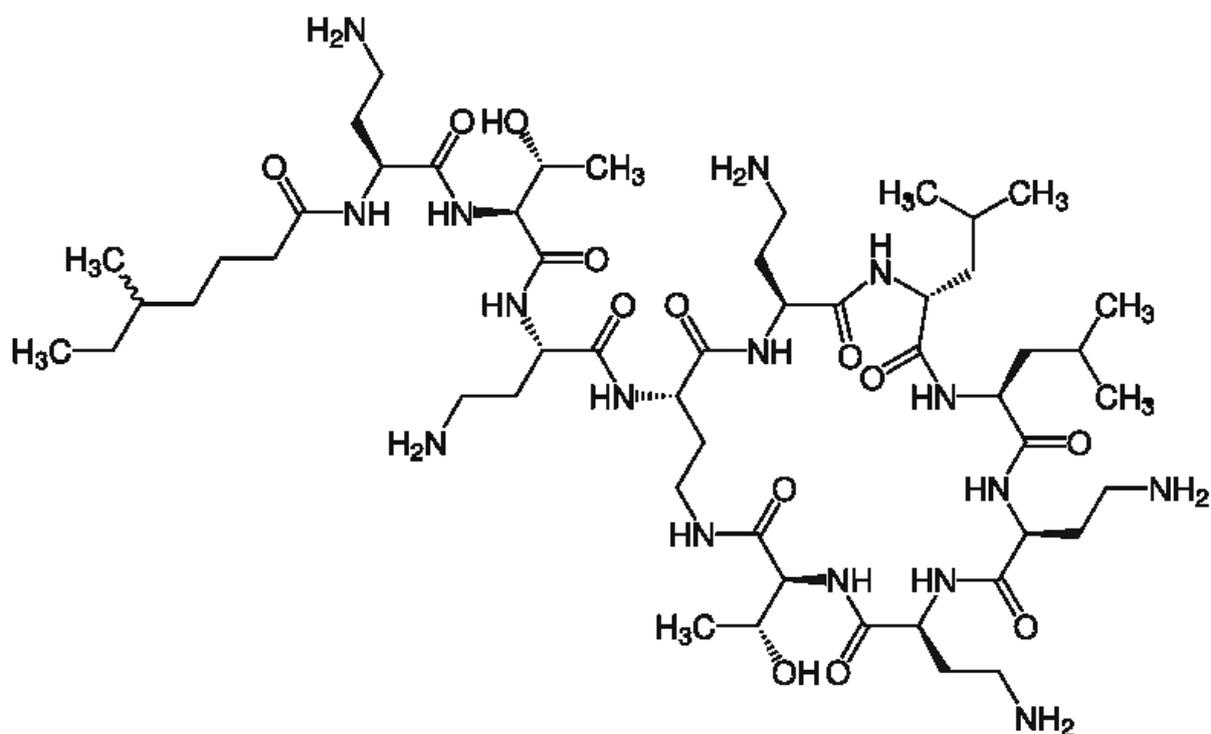


Schéma 10 : Structure de la polymyxine E

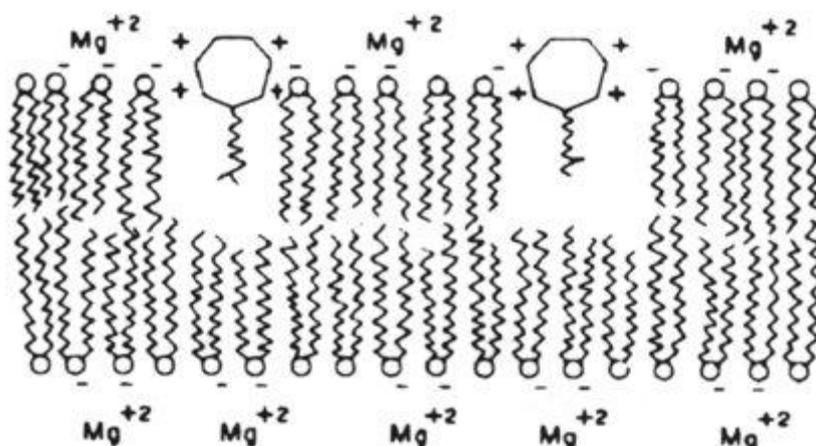


Schéma 11 : Mécanisme d'action des polymyxines

Dans cette famille nombreuse, seule la Polymyxine E et la Polymyxine B sont utilisées en thérapeutique humaine (annexe 8). Leur spectre d'activité est limité aux bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, les entérobactéries (à l'exception des *Proteus* spp., *Morganella morgannii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp.).

2. Les lipopeptides cycliques

Dans cette famille, seule la Daptomycine (commercialisée sous le nom de Cubicin®) est représentée.

Le mécanisme d'action repose sur une liaison à la membrane cytoplasmique via une liaison calcium-dépendante. Une fois dans la membrane plasmique du germe, la Daptomycine induit une formation de pores entraînant une fuite de potassium et une altération du potentiel membranaire (schéma 13). L'effet bactéricide est rapide.

Le spectre d'activité est limité aux bactéries à Gram positif car cette molécule ne traverse pas la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

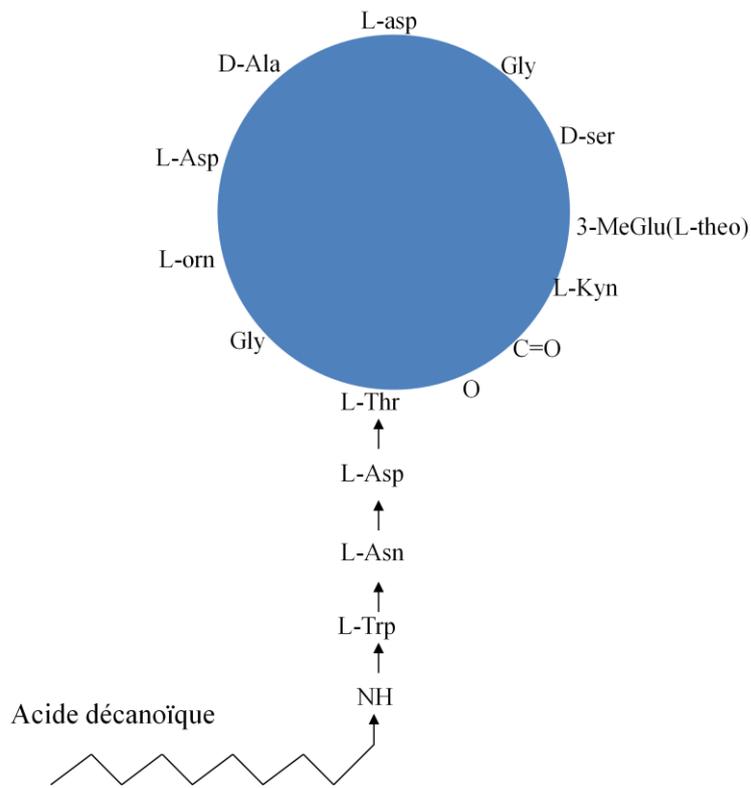


Schéma 12 : Structure de la Daptomycine

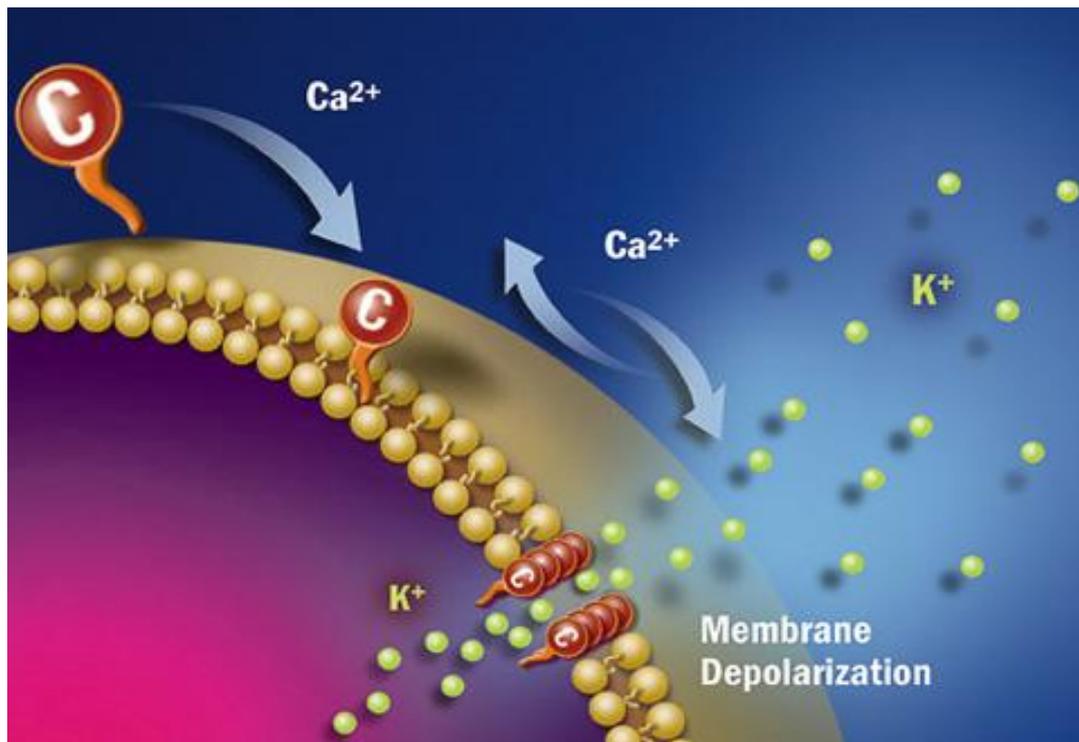


Schéma 13 : Mécanisme d'action de la Daptomycine

C. Antibiotiques actifs sur la synthèse des acides nucléiques

Ces antibiotiques ciblent, particulièrement, les phases de réplication ou de transcription de l'ADN.

1. Inhibition de la réplication de l'ADN

a) Les quinolones

Les quinolones ont une action bactéricide par inhibition rapide de la synthèse de l'ADN et mise en jeu des systèmes SOS¹. [10]

Leurs cibles sont les topo-isomérases bactériennes, essentiellement l'ADN gyrase (ou topo-isomérase II) et la topo-isomérase IV. Ces enzymes ont un rôle majeur dans la concaténation² et décaténation³ de la molécule d'ADN lors de sa réplication (schéma 14).

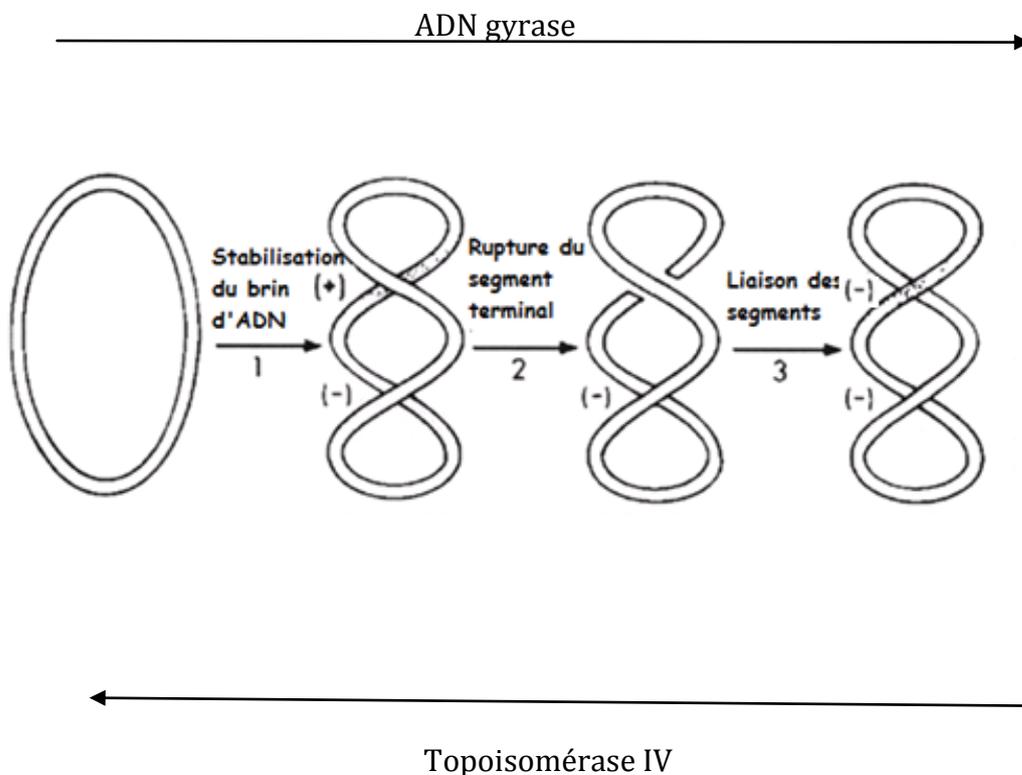


Schéma 14 : Les topo-isomérases bactériennes

¹ Système SOS : système de survie des bactéries en réponse à des lésions importantes de leur ADN

² Concaténation : liaison des chaînes d'ADN

³ Décaténation : rupture des liaisons de la molécule d'ADN

Ces antibiotiques sont issus de la recherche d'antipaludéens et sont donc synthétiques.

Deux générations sont historiquement décrites : les quinolones puis les fluoroquinolones, famille pour laquelle un atome de fluor a été ajouté en position C6¹ afin d'élargir le spectre d'activité (annexe 4).

b) Imidazolés

Les imidazolés sont des molécules dont l'action nécessite une réduction partielle de leur groupement NO₂ que seules les bactéries anaérobies sont capables de réaliser (à l'exception de *Helicobacter pylori* et de *Gardnerella vaginalis*, bactéries micro-aérophiles).

Les dérivés réduits sont les produits biologiquement actifs qui se fixent sur l'ADN, notamment au niveau des régions riches en adénine et thymine, et qui provoquent ainsi une oxydation suivie d'une coupure des brins avec déroulement de l'ADN. Ces lésions de l'ADN sont léthales (schéma 15).

Le métronidazole ou encore l'ornidazole font partie de cette famille d'antibiotiques (annexe 8).

c) Nitrofuranes (annexe 8)

Ces molécules sont considérées comme antiseptiques, dont les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés.

Comme pour les imidazolés, l'activité des nitrofuranes nécessite une réduction de leur groupement NO₂ réalisée par les nitroréductases des bactéries aérobies. Les dérivés réduits provoquent des coupures et des mutations dans l'ADN et leur effet est bactériostatique ou bactéricide selon la dose (schéma 15).

¹ Position C6 : position en carbone 6 des quinolones

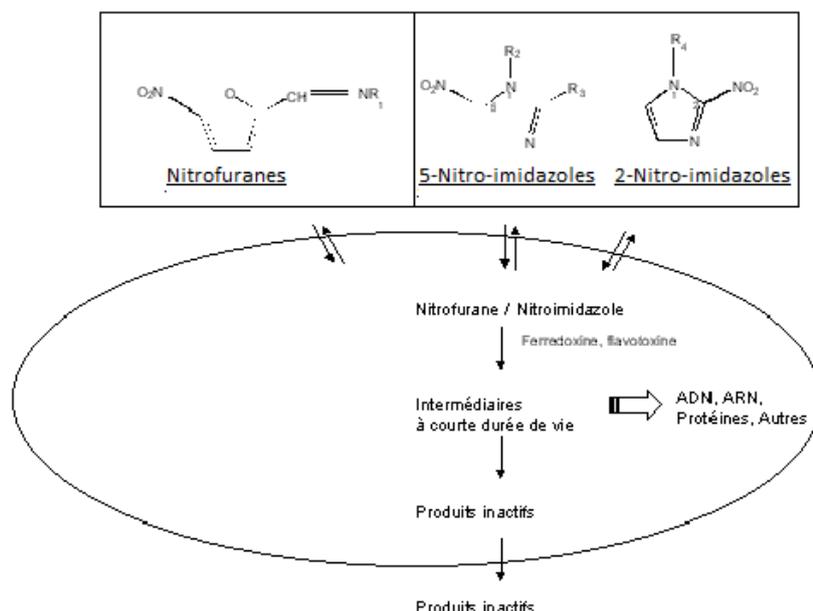


Schéma 15 : Mécanismes d'action des imidazolés et des nitrofuranes

2. Inhibition de la transcription

Les ansamycines font partie de cette catégorie d'antibiotiques et sont représentées par les rifamycines (annexe 8). Ces dernières se fixent sur la sous-unité β de l'ARN polymérase et empêchent l'initiation de la synthèse des ARNm. Elles ne se fixent pas sur l'ARN polymérase déjà liée à l'ADN et n'ont donc pas d'action sur la phase d'élongation de la transcription (schéma 16).

L'absence d'activité des rifamycines sur les ARN polymérases des cellules eucaryotes explique leur toxicité sélective pour les bactéries.

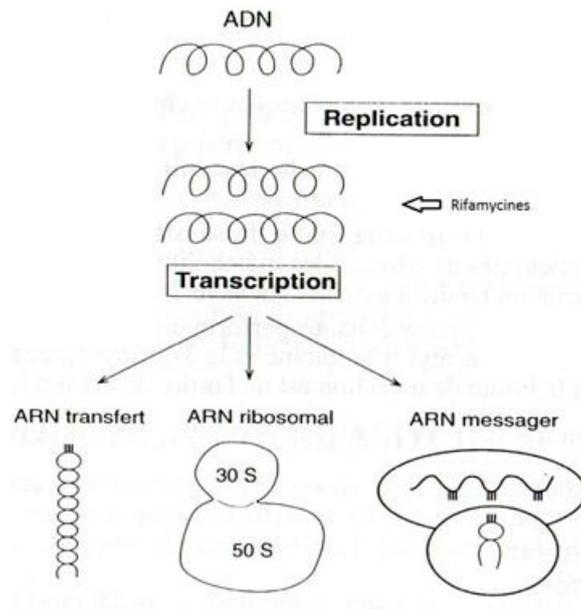
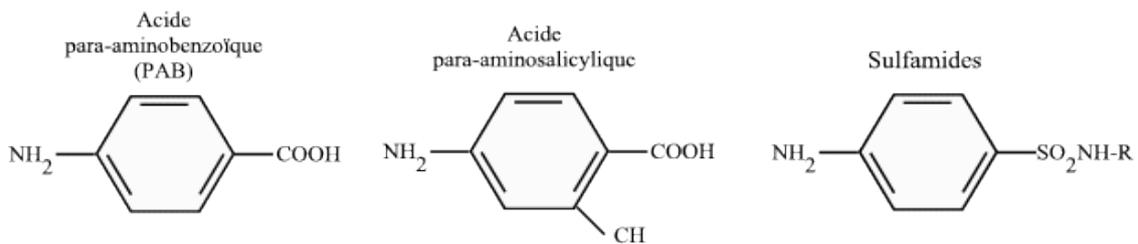
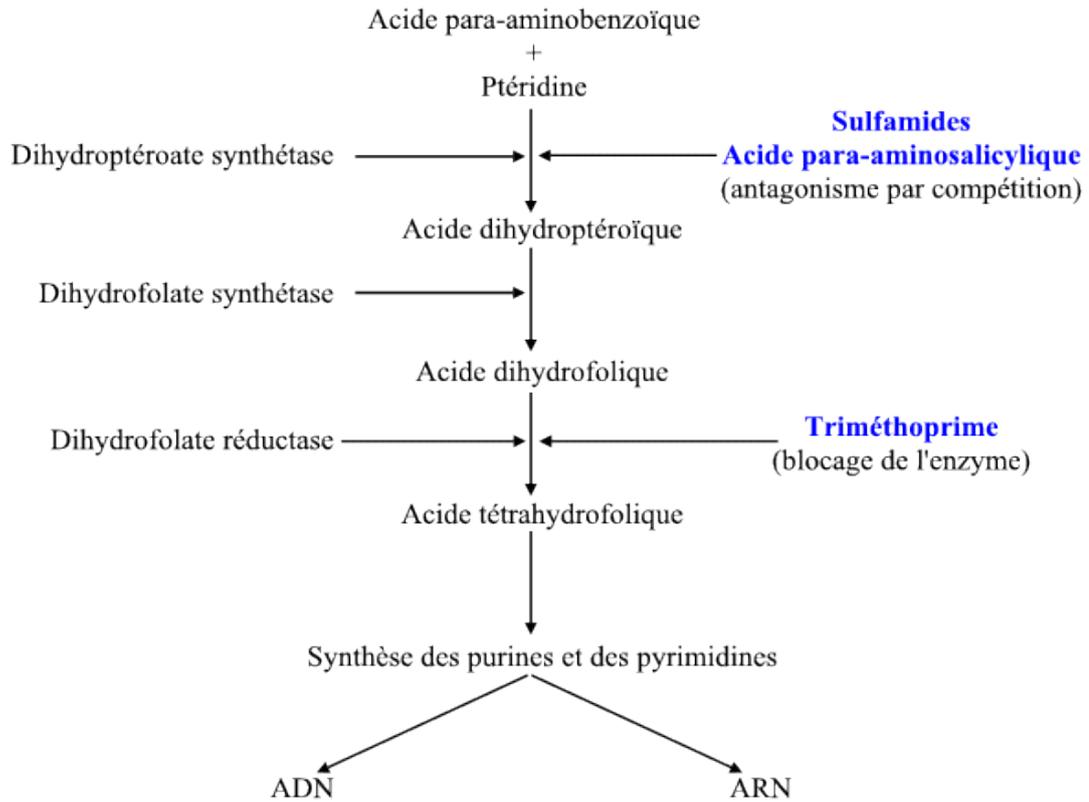


Schéma 16 : Mécanisme d'action des rifamycines [5]

3. Autres mécanismes

D'autres mécanismes sont recensés dans l'action des antibiotiques sur la synthèse d'acides nucléiques. En effet, les sulfamides et le triméthoprim agissent à deux niveaux différents pour inhiber la synthèse de l'acide tétrahydrofolique. Ce dernier intervient dans de nombreuses voies métaboliques et notamment dans la synthèse des purines et des pyrimidines. Chez les bactéries, sa synthèse se fait en trois étapes dont la première nécessite de l'acide para-aminobenzoïque ou PAB (schéma 17).



Analogies structurales entre le PAB, l'acide para-aminosalicylique et les sulfamides

Schéma 17 : Mécanisme d'action des sulfamides et du Triméthoprim

a) Sulfamides

Le mode d'action des sulfamides est lié à une inhibition de la dihydroptéroate synthétase en raison d'une analogie structurale avec le PAB. L'action des sulfamides est réversible et s'annule en présence d'un excès de PAB ou de certains métabolites terminaux dont la thymidine.

b) Les 2,4-diaminopyrimidines

Les 2-4-diaminopyrimidines, comme le triméthoprim, sont des analogues stériques du noyau ptéridine de l'acide dihydrofolique. Ils inhibent l'action de la dihydrofolate réductase.

L'association de sulfamide, de type sulfaméthoxazole, et de 2-4-diaminopyrimidine est souvent synergique et bactéricide (annexe 8).

c) Acide para-aminosalicylique

L'acide para-aminosalicylique (PAS) a également une structure analogue au PAB et son mécanisme d'action est comparable à celui des sulfamides. Toutefois, cette molécule est active sur les mycobactéries et inactive chez les autres bactéries. Les enzymes responsables de la synthèse de l'acide folique diffèrent donc chez les mycobactéries.

D. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines

Plusieurs familles d'antibiotiques inhibent la synthèse des protéines en agissant préférentiellement soit sur la sous-unité 30S soit sur la sous-unité 50S des ribosomes.

1. Aminosides (annexe 5)

Le mode d'action de la streptomycine a bien été étudié. Elle se fixe sur une région de la sous-unité 30S du ribosome et, en provoquant des erreurs de reconnaissance codons – anticodons, entraîne l'incorporation d'acides aminés erronés dans la chaîne peptidique en formation.

Les autres aminosides ont des actions similaires à la streptomycine. Cependant, ils se fixent à la fois sur la sous-unité 30S et 50S du ribosome mais agissent aussi sur d'autres stades de la traduction (schéma18).

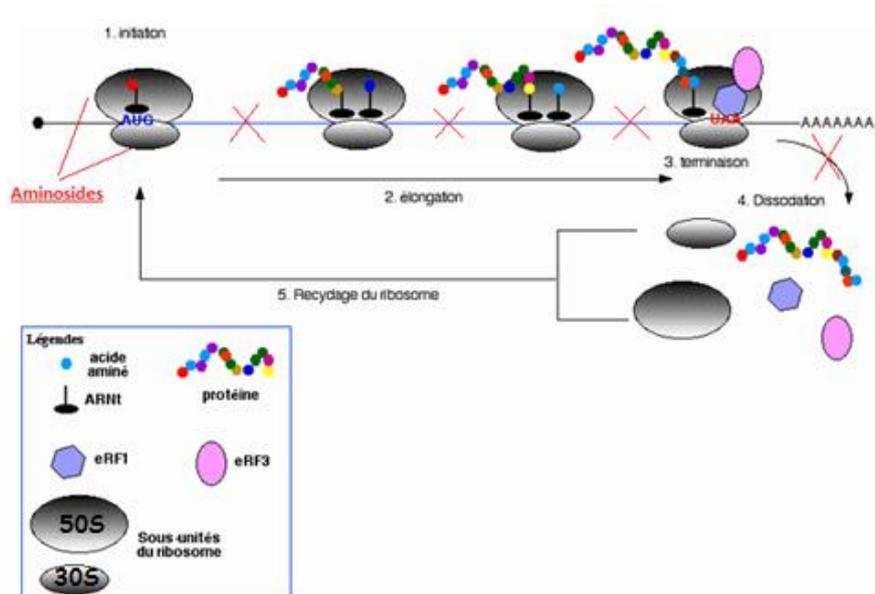


Schéma 18 : Mécanisme d'action des aminosides

2. Tétracyclines (annexe 6)

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre. Elles agissent particulièrement sur les bactéries intracellulaires et les mycoplasmes. Leur transfert intra-cytoplasmique est médié via une diffusion passive mais aussi via des systèmes de transport actif permettant l'accumulation dans les bactéries.

Les tétracyclines se fixent sur la sous unité 30S des ribosomes. Cette fixation inhibe l'attachement aminoacyl-ARNt au site A¹ du ribosome et bloque l'étape de reconnaissance de la phase d'élongation de la chaîne peptidique (schéma 20).

¹ Site A du ribosome : site de fixation de l'ARNt porteur d'acides aminés pendant la traduction

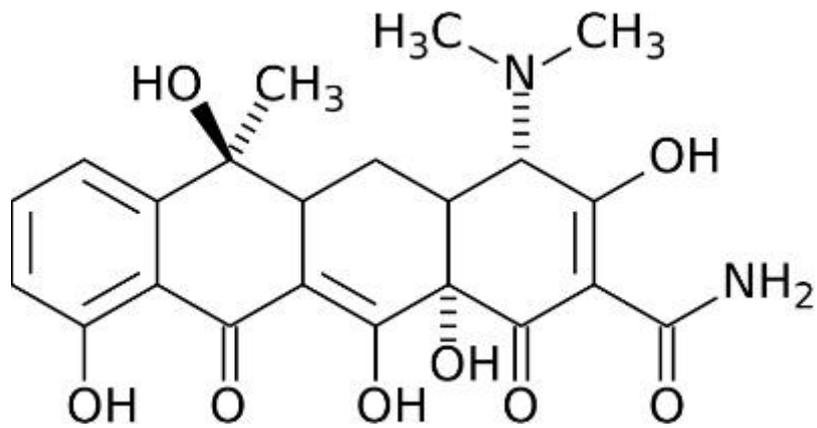


Schéma 19 : Structure des tétracyclines

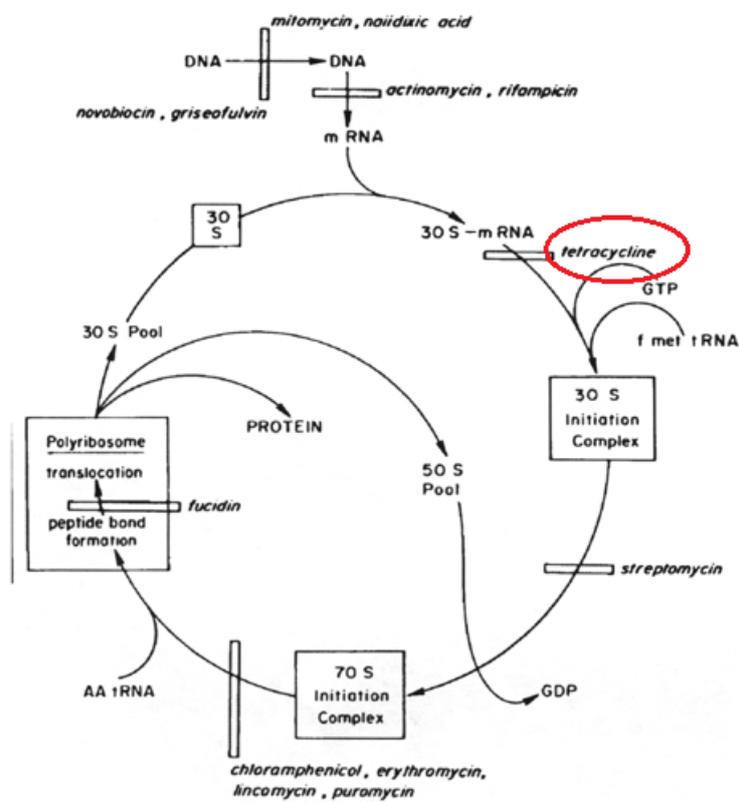


Schéma 20 : Mécanisme d'action des tétracyclines

Une nouvelle classe apparentée aux Tétracyclines a été développée : les Glycylcyclines. L'antibiotique commercialisé à ce jour est le 9-t-butylglycylamido-minocycline ou Tigécycline (schéma 21) sous le nom commercial Tigacyl®.

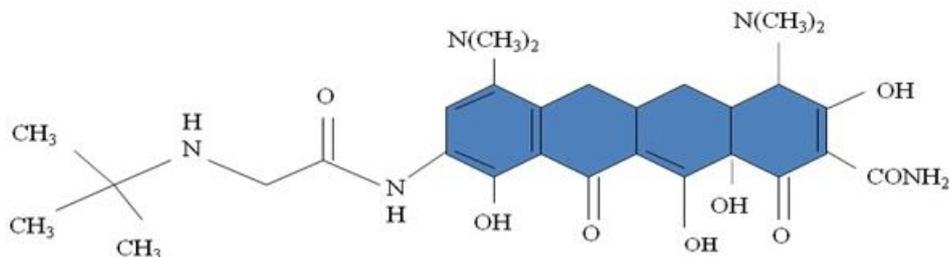


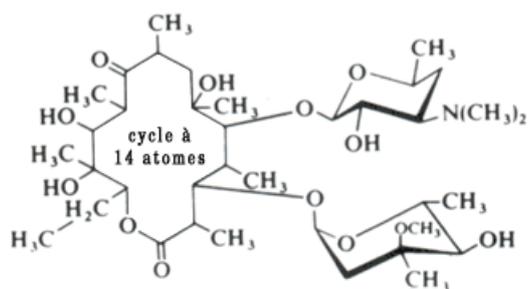
Schéma 21 : Structure de la Tigécycline

Il s'agit d'un antibiotique bactériostatique, son spectre d'activité est plus large que celui des tétracyclines si ce n'est que son activité est médiocre chez les *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, et *B. fragilis*.

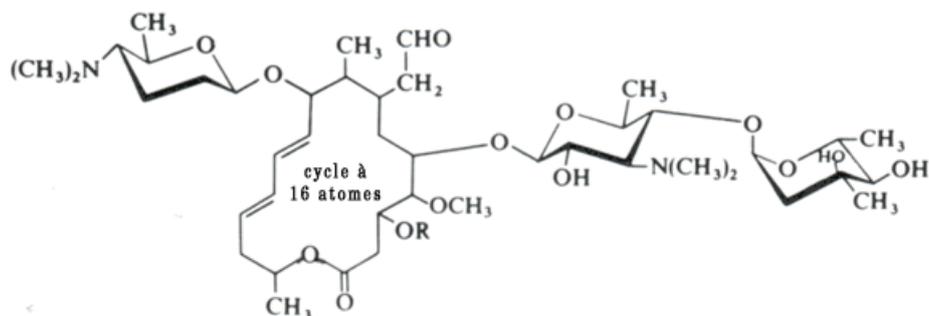
3. Macrolides et apparentés (annexe 7)

Les macrolides, lincosamides et synergistines sont apparentés par leur spectre d'activité, leur mécanisme d'action et les mécanismes de résistance. Ils ont pour point commun une structure chimique de taille importante comportant un macrocycle (schéma 22).

Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S, notamment au niveau de l'ARN ribosomal. Le mécanisme exact de leur action est encore mal connu (schéma 23).



Erythromycine A



Spiramycine I R = H
 II R = COCH₃
 III R = COCH₂CH₃

Schéma 22 : Structure chimique de l'Erythromycine A et de la Spiramycine

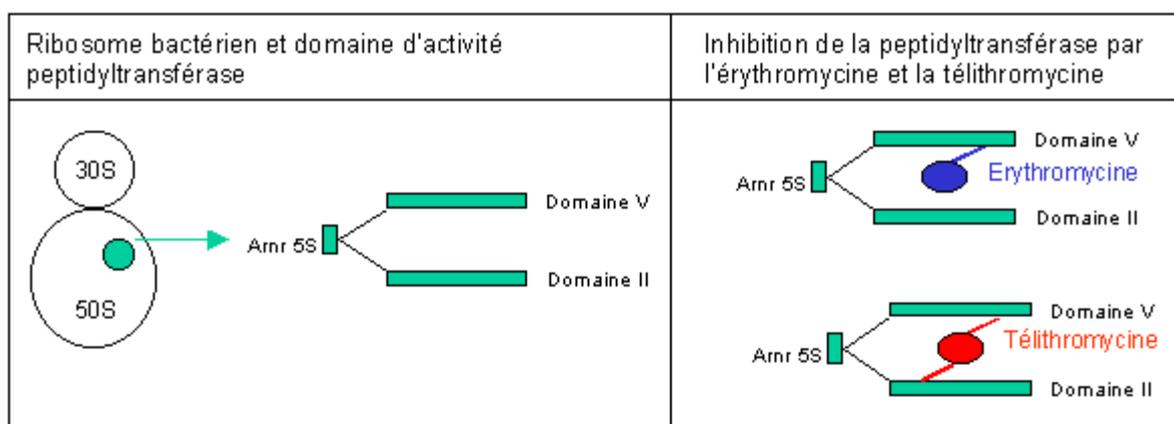


Schéma 23 : Mécanismes d'action de l'Erythromycine et de la Télithromycine

Les lincosamides semblent surtout inhiber la formation des liaisons peptidiques. Leur site de fixation sur la sous-unité 50S semble identique à celui des macrolides et ils sont capables de déplacer ces derniers.

Les synergistines sont formées de deux composants macrocycliques A et B. Chacun de ces 2 composants, pris isolément, entraîne une bactériostase par blocage réversible de la synthèse protéique. Leur association est synergique et entraîne une bactéricidie par blocage irréversible des synthèses protéiques.

4. Linézolide

Il s'agit du premier antibiotique de la famille des oxazolidinones. Le linézolide, dont le nom commercial est Zyvoxid®, se fixe sur la sous-unité 50S du ribosome, près de son centre catalytique. Il induit ainsi une inhibition de la synthèse de protéines mitochondriales entraînant un arrêt de la multiplication bactérienne. Cet antibiotique est actif sur les bactéries à Gram positif.

5. Phénicolés (annexe 8)

Le mécanisme d'action des phénicolés demeure imprécis. Le thiamphénicol se fixe préférentiellement sur le site A au niveau de la sous-unité 50S. Le chloramphénicol quant à lui, peut interférer avec la synthèse mitochondriale des protéines ce qui pourrait expliquer certains de ses effets toxiques hématologiques.

6. Acide fusidique

L'acide fusidique, ou Fucidine®, est un antibiotique de nature stérolique et hydrophobe. Il est donc actif uniquement sur les bactéries à Gram positif, et particulièrement les staphylocoques. Il intervient au cours de la translocation et inhibe la phase d'élongation des synthèses peptidiques. Cette action semble liée à une stabilisation par l'acide fusidique d'un complexe ribosome-facteur d'élongation, complexe qui doit normalement se dissocier après la translocation du peptide.

III. La résistance des bactéries aux antibiotiques

La découverte de ces antibiotiques, et notamment les pénicillines, a suscité un grand espoir dans le traitement des maladies infectieuses. Malheureusement, leur introduction a entraîné l'émergence de bactéries résistantes engendrant de nombreux échecs thérapeutiques.

Cette résistance peut être de deux types : naturelle ou acquise. [11] [16]

A. La résistance naturelle

La résistance naturelle est commune à tout un genre bactérien. Elle se transmet toujours à la descendance, de manière verticale et détermine les souches dites « sauvages ». Par exemple, les anaérobies sont naturellement résistants aux aminosides, les bactéries à Gram négatif aux glycopeptides, et les bactéries à Gram positif aux polymyxines.

B. La résistance acquise

D'autres résistances peuvent apparaître par mutation chromosomique ou par acquisition de matériels génétiques étrangers. Ces derniers sont véhiculés par un élément mobile (plasmides, transposon) qui a la capacité d'être transmissible de manière horizontale (de bactérie à bactérie).

Cette résistance acquise est imprévisible et nécessite la réalisation d'un antibiogramme pour être détectée.

La résistance aux antibiotiques peut intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes non exclusifs.

- L'inactivation de l'antibiotique (mécanisme le plus fréquent) : il s'agit d'une enzyme qui modifie ou clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. Exemple des β -lactamases.

- La modification de la cible de l'antibiotique : Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule (comme la liaison des pénicillines sur les PLP). La présence d'une modification de la cible peut empêcher ainsi la liaison de l'antibiotique. En terme de résistance acquise, on peut observer une modification partielle de la nature de la cible (modification chimique par méthylation), une modification du nombre (hyperproduction ou suppression de cible), un changement total (nouvelle cible) ou parfois une association de plusieurs mécanismes.
- La réduction de la perméabilité membranaire : elle repose sur une réduction du nombre de porines. Il peut s'agir de la diminution quantitative d'un ou plusieurs types de porines ou d'une modification de la structure d'une des porines essentielles.
- L'efflux des antibiotiques : phénomène qui consiste à éliminer l'antibiotique de la cellule par le système d'une pompe à extrusion, mécanisme utilisant une force motrice pour expulser une molécule dès qu'elle apparaît dans la cellule.

Les bactéries sont dites multirésistantes (BMR) aux antibiotiques lorsqu'elles sont résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques dont les β -lactamines.

Deuxième partie

Les Bactéries multirésistantes (BMR)

I. Définition des bactéries multirésistantes (B.M.R)

On parle de BMR pour des bactéries ayant acquis plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques à l'origine de difficultés thérapeutiques. [17]

Ces bactéries multirésistantes peuvent être responsables :

- d'un problème thérapeutique si elles sont responsables d'infections,
- d'une épidémie du fait de leur capacité de diffusion.

Ces deux risques majeurs ont conduit certains établissements hospitaliers à une politique systématique de dépistage.

II. Les différentes BMR

Ces bactéries multirésistantes concernent aussi bien les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

Parmi les souches à Gram positif, nous retrouvons :

- *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM),
- *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA),
- Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) et notamment les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV).

Et parmi les souches à Gram négatif, nous distinguons :

- Entérobactéries sécrétrices de β - lactamase à spectre étendu (EBLSE),
- Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC),
- *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR).

Certaines catégories de bactéries multirésistantes peuvent être rattachées à ce groupe :

- Entérobactéries résistantes aux β - lactamines par hyperproduction de céphalosporinases (EBCASE),
- *Acinetobacter baumannii* multirésistant (ABR).

Les programmes de lutte contre la diffusion des BMR concernent les SARM, les VRE et les EBLSE.

III. Evolution et origine de la résistance bactérienne

Les bactéries résistantes sont apparues à partir des années 40 avec l'émergence, dans un premier temps, de souches de *Staphylococcus aureus* productrices de pénicillinase. Ces résistances se sont multipliées par dissémination et sont devenues aujourd'hui un phénomène planétaire très préoccupant, pas uniquement dans les établissements de soins mais aussi dans la communauté.

Des gènes conférant des phénotypes nouveaux de résistance sont régulièrement mis en évidence. Cette évolution est la conséquence de l'utilisation intensive des antibiotiques, phénomène décrit sous le terme de « pression de sélection ».

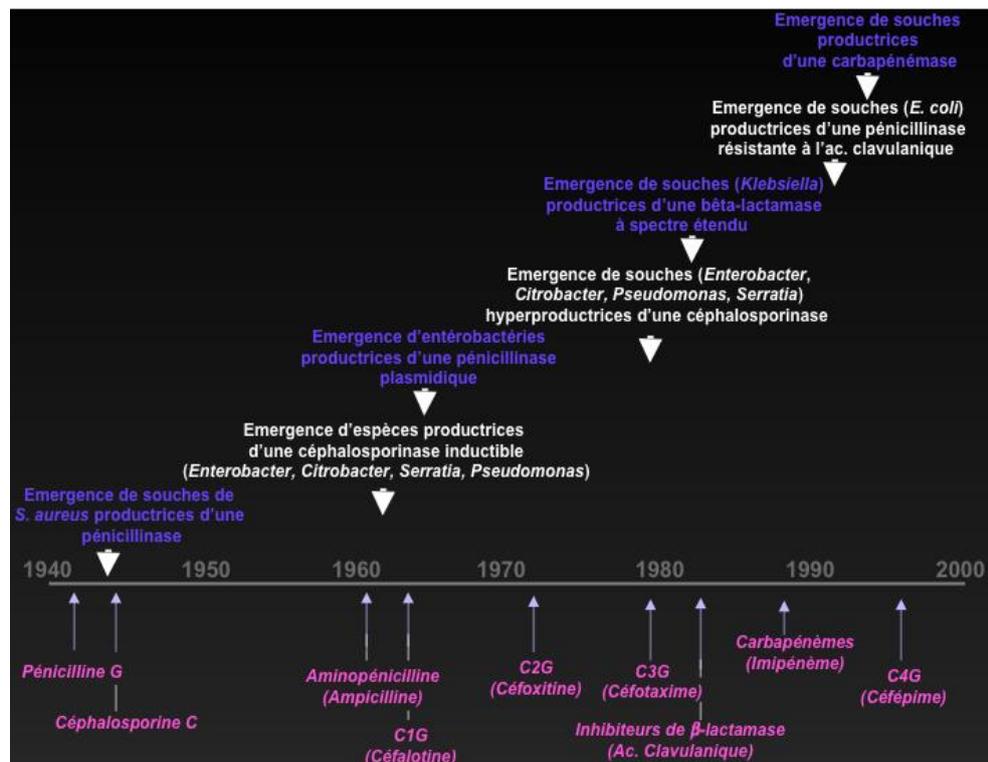


Schéma 24 : Evolution des résistances de 1940 à 2000

Il a été constaté que l'utilisation thérapeutique de chaque nouvel antibiotique s'accompagne de l'apparition d'une résistance bactérienne. Cette évolution de la résistance a été corrélée à la consommation des antibiotiques. Ainsi, en Europe, les pays du Sud sont les plus gros consommateurs et rapportent en parallèle les taux de résistance les plus élevés d'Europe (schéma 25).

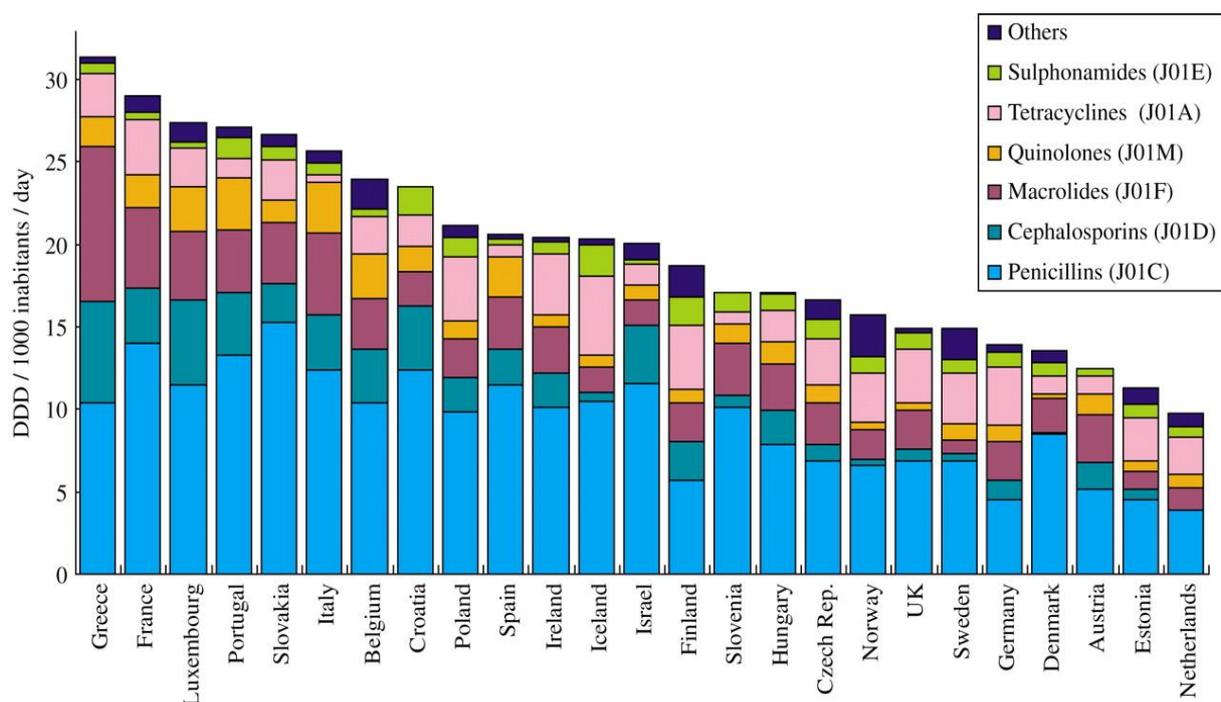


Schéma 25 : Consommation des antibiotiques en ville en 2003

IV. Mécanismes de résistances des BMR

Divers mécanismes de résistance sont recensés dans cette famille de bactéries :

- la résistance par modification de cible,
- la résistance par production d'enzymes :
 - ✓ plasmidiques : β LSE, certaines carbapénémases,

- ✓ chromosomiques : dérégulation¹ de la synthèse céphalosporinase,
- la résistance par imperméabilité à l'antibiotique,
- la résistance par mécanisme d'efflux.

A. *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)

Les SARM font partie des premières BMR décrites dans les années 50. Leur prévalence est notée en majorité au sud de l'Europe (schéma 26).

Ces souches de *staphylococcus aureus* ont un fort pouvoir adaptatif et ont développé des mécanismes de résistance aux β -Lactamines : la sécrétion de pénicillinase et la modification de la cible par substitution des PLPs habituelles par une nouvelle PLP, la PLP 2a, ayant une faible affinité pour les β -Lactamines, ce qui confère à ces souches une résistance à toutes les β -Lactamines.

Deux populations de SARM sont distinguées : les SARM hospitaliers, responsables majoritairement d'infections nosocomiales et les SARM communautaires, décrits dans des infections communautaires, associées à la sécrétion de toxines dermonécrotiques, responsables d'infections cutanées récidivantes mais aussi de pneumopathies, d'ostéoarthrites voire de septicémies. [20]

Pour les SARM hospitaliers, le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, rendant compte du profil de multirésistance.

¹ Dérégulation : phénomène de levée des mécanismes qui répriment la transcription d'un gène

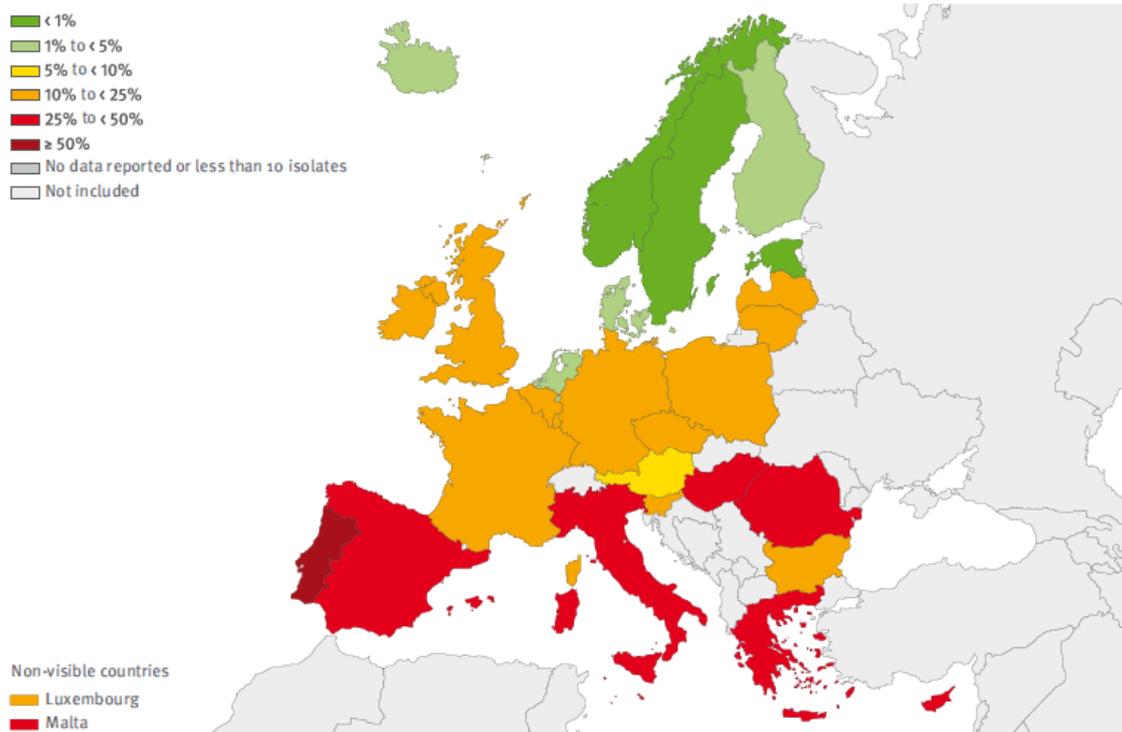


Schéma 26 : Prévalence des SARM en Europe en 2010 [14]

B. *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux Glycopeptides

Les glycopeptides, tels que la vancomycine et la teicoplanine, sont des alternatives thérapeutiques en cas de SARM. Cependant des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ont été rapportées. [13]

Le premier cas clinique d'infection par un GISA a été rapporté chez un jeune japonais en 1996. Depuis, plusieurs cas semblables ont été documentés aux Etats-Unis, en France, ainsi qu'en Amérique du Sud, en Australie et au Royaume-Uni.

Le mécanisme de résistance des souches GISA n'est pas éclairci, hormis pour les rares souches ayant acquis les gènes de résistance *vanA* classiquement décrits chez les entérocoques.

Des souches GISA homogènes, c'est-à-dire des souches qui présentent toute la même résistance, sont distinguées des souches GISA hétérogènes, qui ne concernent qu'une fraction seulement de la population bactérienne.

L'émergence des GISA peut être secondaire à une exposition prolongée aux glycopeptides. Les facteurs favorisant additionnels à ce jour comprennent le recours aux procédures invasives, en particulier les cathéters intravasculaires et la dialyse. La présence d'un corps étranger semble jouer un rôle important dans la genèse ou dans la persistance de l'infection dans la plupart des cas cliniques rapportés.

Des études ont mis en évidence une augmentation progressive sur 10 ans des CMI des glycopeptides vis-à-vis des souches de *S. aureus* (Schéma 27).

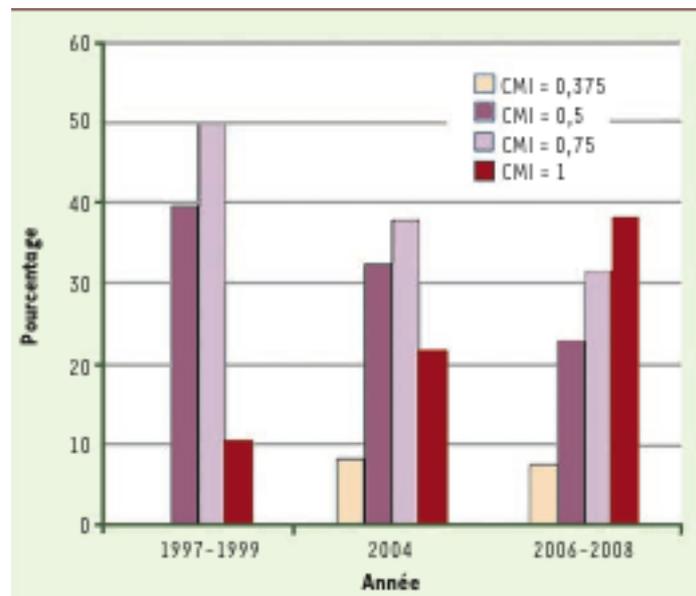


Schéma 27 : Evolution de la sensibilité aux Glycopeptides des SARM [13]

Chez des patients porteurs de souches de *S. aureus* ayant une CMI égale à 2 mg/l, un taux de mortalité plus élevé a été observé, comparé aux patients porteurs de souches ayant des CMI inférieure ou égales à 1 mg/l (Schéma 28).

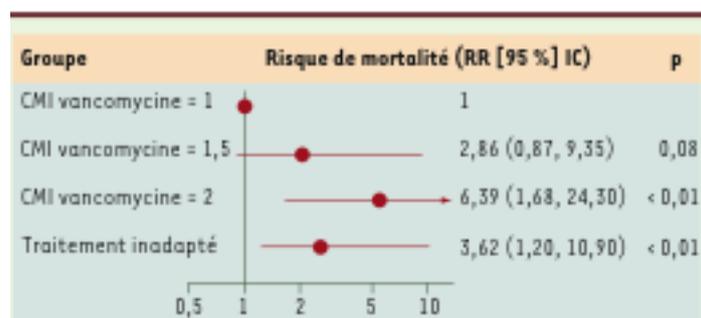


Schéma 28 : Corrélation entre la CMI et le pronostic des infections à SARM [13]

Ces observations cliniques suggèrent une perte d'efficacité thérapeutique de la vancomycine dès lors que les patients sont infectés par des souches dont la CMI de vancomycine avoisine la valeur de 2 mg/l.

Compte-tenu de ces observations et dans le but de mieux encadrer la prescription de glycopeptides, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) a modifié en 2011 les cutt offs¹ des glycopeptides. Ainsi, une souche de *S. aureus* est considérée comme « résistante » si la CMI est supérieure à 2 mg/l au lieu de 4 mg/l comme auparavant. La conséquence attendue est une augmentation de la détection du nombre de GISA.

Voici un tableau comparatif des cutt offs pour les deux glycopeptides de 2009 à 2012 entre les différents organismes internationaux : CA-SFM (français), EUCAST² (européen) et le CLSI³ (américain) pour les souches de *S. aureus* et les souches de staphylocoque à coagulase négative (SCN) :

¹ Cutt offs : valeurs limites de concentration

² EUCAST : EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

³ CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

| Organisme | Vancomycine | | Teicoplanine | |
|--|------------------|------|--------------|-----|
| | CA-SFM 2009 | ≤ 4 | > 16 | ≤ 4 |
| CA-SFM 2010 | ≤ 4 | > 8 | ≤ 4 | > 8 |
| CA-SFM 2011 | <i>S. aureus</i> | | | |
| | ≤ 2 | > 2 | ≤ 2 | > 2 |
| | SCN | | | |
| | ≤ 2 | > 2 | ≤ 4 | > 4 |
| EUCAST 2011 Pas de diamètre : détermination de CMI | ≤ 2 | > 2 | ≤ 4 | > 4 |
| CLSI 2011 | <i>S. aureus</i> | | Non utilisé | |
| | ≤ 2 | ≥ 16 | | |
| | SCN | | | |
| | ≤ 4 | ≥ 32 | | |

C. Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)

Les entérocoques, en France principalement dues à *Enterococcus faecalis* (80 à 90% des cas) et *Enterococcus faecium* (dans 5 à 10 % des cas), sont responsables d'infections humaines. Les autres espèces, telles que *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae*, sont plus rares. [8] [16]

Les entérocoques ont développé au fil des années une multirésistance aux antibiotiques dont les glycopeptides. Chez les entérocoques naturellement résistants à la vancomycine (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*), le D-Ala-D-Ala, site normal de fixation des glycopeptides, est remplacé par du D-Ala-D-Ser, dipeptide ayant moins d'affinité pour la vancomycine, mais une affinité normale pour la teicoplanine. Ce mécanisme est codé par le gène *vanC*.

Les mécanismes de résistance acquise décrits chez les entérocoques sont médiés par les gènes *vanA*, *vanB*, *van E*, *vanG*. Leurs principales caractéristiques figurent dans le schéma n°29.

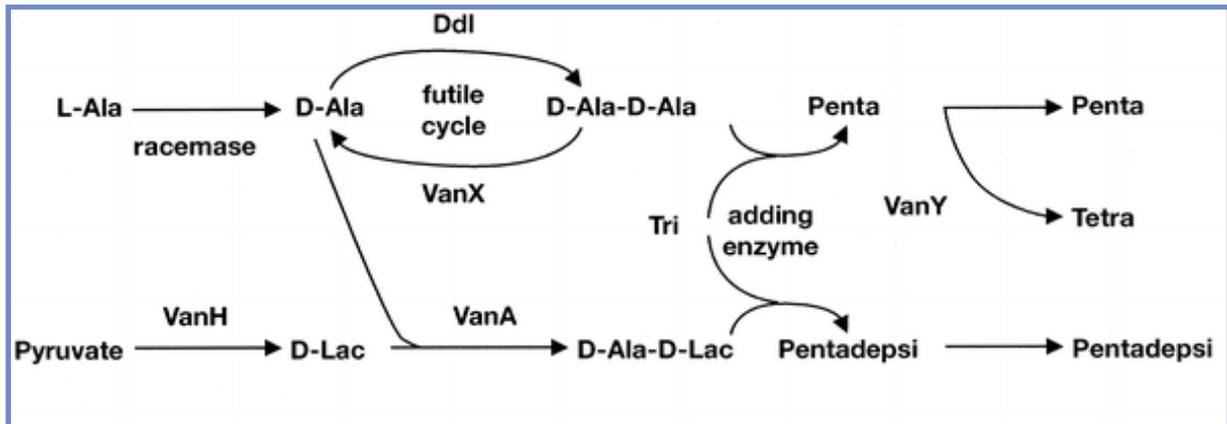
Résistance aux glycopeptides chez les entérocoques

| Résistance | Acquise | | | | | Intrinsèque |
|----------------|--|--|---|--------------------|----------------------------|---|
| | Haut niveau | Niveau variable | Niveau moyen | Bas niveau | | Bas niveau |
| Type | VanA | VanB | VanD | VanG | VanE | VanC1/C2/C3 |
| CMI (mg/L) | | | | | | |
| Vancomycine | 64 - 1000 | 4 - 1000 | 64 - 128 | 16 | 8-32 | 2 - 32 |
| Teicoplanine | 16 - 512 | 0,5 - 1 | 4 - 64 | 0,5 | 0,5 | 0,5 - 1 |
| Espèce | <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i> | <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. bovis</i> | <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i> |
| Expression | Inductible (Constitutive) | | Constitutive | Inductible | Inductible Constitutive | Constitutive Inductible |
| Cible modifiée | ↓ D-Ala-D-Lac | | | ↓ D-Ala-D-Ser | | |

Schéma 29 : Phénotypes de résistance des entérocoques aux glycopeptides

Pour le phénotype VanA, le transposon support de la résistance code, entre autres, pour trois protéines au rôle primordial : VanA, VanH et VanX.

Le D-Ala-D-Ala est remplacé par du D-Ala-D-Lac. Le D-Lac est fabriqué par VanH à partir du pyruvate. La protéine VanA est une D-Ala-D-Lac ligase. Les précurseurs possèdent donc un dipeptide D-Ala-D-Lac terminal ayant peu d'affinité pour les glycopeptides. La protéine VanX élimine les résidus D-Ala-D-Ala (schéma30).



- | | | |
|-----------------------------|---|--|
| VanH = Deshydrogénase | } | Précurseur modifié : dipeptide D-Ala-D-Lac terminal |
| VanA = D-Ala-D-Lac ligase | | |
| Van X = D,D-dipeptidase | } | Elimination des résidus D-Ala-D-Ala de forte affinité |
| VanY = D,D-carboxypeptidase | | |

Schéma 30 : Mécanismes de résistance des entérocoques aux glycopeptides

Des épidémies sont survenues récemment en milieu hospitalier dues à des souches d'*E. faecium* appartenant à un complexe clonal (CC17) adapté à l'hôpital (Schéma 31). Suite à ces épidémies et notamment en France en 2004 (5-10 % de souches), diverses recommandations ont été émises. L'application de celles-ci a permis le contrôle plus ou moins rapide des épidémies à chaque signalement.

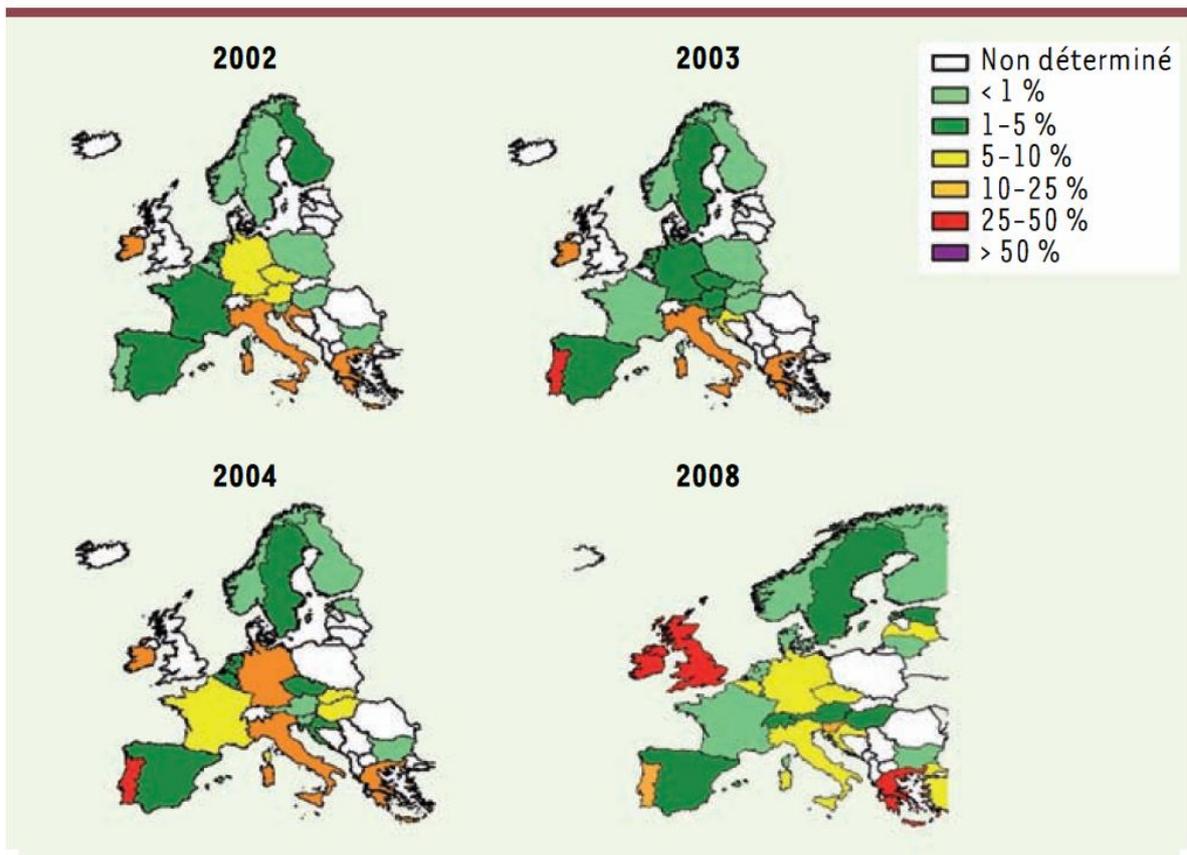


Schéma 31 : Evolution de la proportion de cas de résistance à la vancomycine. Résistance chez les souches d'*E. faecium* isolées d'hémocultures en Europe de 2002 à 2008 [8]

D. Les Entérobactéries :

Les entérobactéries représentent la deuxième cause d'infections graves après les cocci à Gram positif. Elles sont classées en fonction de leur phénotype naturel de résistance. Elles peuvent aussi devenir multirésistantes, essentiellement par les trois mécanismes que sont la production d'une bêta-lactamase à spectre élargi, une dérégulation de leur céphalosporinase chromosomique (hyperproduite) ou une production de carbapénémase.

Voici une classification générale de ces entérobactéries :

| Genres | Espèce(s) type(s) |
|---|--|
| <i>Escherichia</i> <i>Shigella</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>Edwardsiella</i> | |
| <i>Salmonella</i> | <i>S. enterica</i> |
| <i>Citrobacter</i> | <i>C. freundii</i> |
| <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Hafnia</i> <i>Serratia</i> | <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>H. alvei</i> <i>S. marcescens</i> |
| <i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i> | <i>P. mirabilis</i> <i>M. morgani</i> <i>P. stuartii</i> |
| <i>Yersinia</i> | <i>Y. enterocolitica</i> |
| <i>Erwinia</i> | |
| <i>Buttiauxella</i> <i>Cedecea</i> <i>Ewingella</i> <i>Kluyvera</i> <i>Tatumella</i> <i>Rahnella</i> | |

Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β -lactamines est la sécrétion de β -lactamases. Celles-ci sont historiquement décrites en 4 classes selon la classification dite d'Amblar¹.

- Classe A : β -lactamases inhibées par l'acide clavulanique,
- Classe B : carbapénémases de type métallo-enzyme²,
- Classe C : les céphalosporinases,
- Classe D : enzymes de classement indéterminé. [6]

¹ Classification d'Amblar : Classification des β -lactamases selon Amblar en 1940. Elle est basée sur quatre classes catégorisées selon leurs analogies de séquence peptidique.

² Métallo-enzymes : enzymes ayant au moins un atome de zinc dans leur site actif (classe B de Amblar)

Cette classification a été actualisée par Bush *et al.*¹(Schéma 32).

| Familles d'enzymes ^a | Groupes fonctionnels et sous-groupes | Nombre d'enzymes ^{b,c} | Enzymes représentatives |
|---------------------------------|--|---------------------------------|---|
| CMY | 1, 1e | 50 | CMY-1 à CMY-50 |
| TEM | 2b, 2be, 2br, 2ber 2b 2be 2br 2ber | 172 12 79 36 9 | TEM-1, TEM-2, TEM-13 TEM-3, TEM-10, TEM-26 TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163 TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9) |
| SHV | 2b, 2be, 2br 2b 2be 2br | 127 30 37 5 | SHV-1, SHV-11, SHV-89 SHV-2, SHV-3, SHV-115 SHV-10, SHV-72 |
| CTX-M | 2be | 90 | CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) à CTX-M-92 |
| PER | 2be | 5 | PER-1 à PER-5 |
| VEB | 2be | 7 | VEB-1 à VEB-7 |
| GES | 2f | 15 ^d | GES-2 à GES-7 (IBC-1) to GES-15 |
| KPC | 2f | 9 | KPC-2 à KPC-10 |
| SME | 2f | 3 | SME-1, SME-2, SME-3 |
| OXA | 2d, 2de, 2df 2d 2de 2df | 158 5 9 48 | OXA-1, OXA-2, OXA-10 OXA-11, OXA-14, OXA-15 OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58 |
| IMP | 3a | 26 | IMP-1 à IMP-26 |
| VIM | 3a | 23 | VIM-1 à VIM-23 |
| IND | 3a | 8 | IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 à IND-7 |

^a Famille d'enzymes incluant les références numériques basées sur la structure primaire des acides aminés.

^b Répertoire Décembre 2009

^c Le nombre total de sous-groupes n'est pas égal au nombre total d'enzymes dans chaque famille puisque certaines enzymes ont été retirées et d'autres n'ont pas été répertoriées par les enquêteurs ayant fourni la séquence d'acides aminés.

^d GES-1, contrairement aux autres membres de la famille des GES, présente peu d'interaction avec l'imipénème.

Schéma 32 : Classification de la famille des bêta-lactamases d'importance clinique selon Bush *et al.* [6]

Le nombre de souches résistantes par production de β -lactamases augmente au fil du temps (schéma 33). La France figure parmi les pays ayant la plus forte prévalence de souches d'*E.coli* résistantes aux C₃G² en 2010 (schéma 34).

¹ Classification de Bush *et al.* : Actualisation de la classification d'Ambler par Bush-Jacobi-Medeiros. Elle comprend 3 grands groupes : 1, 2 (avec 8 sous-groupes) et 3, classés selon le profil de substrat et le profil d'inhibition des β -lactamases

² C₃G : Céphalosporines de 3^{ème} génération

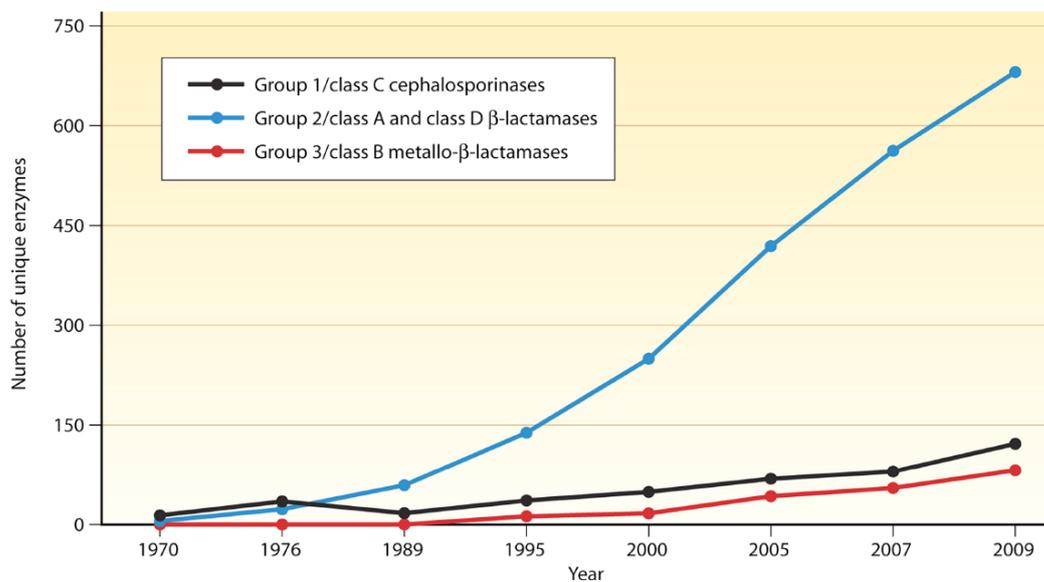


Schéma 33 : Evolution des souches sécrétrices de β -lactamases de 1970 à 2009 [6]

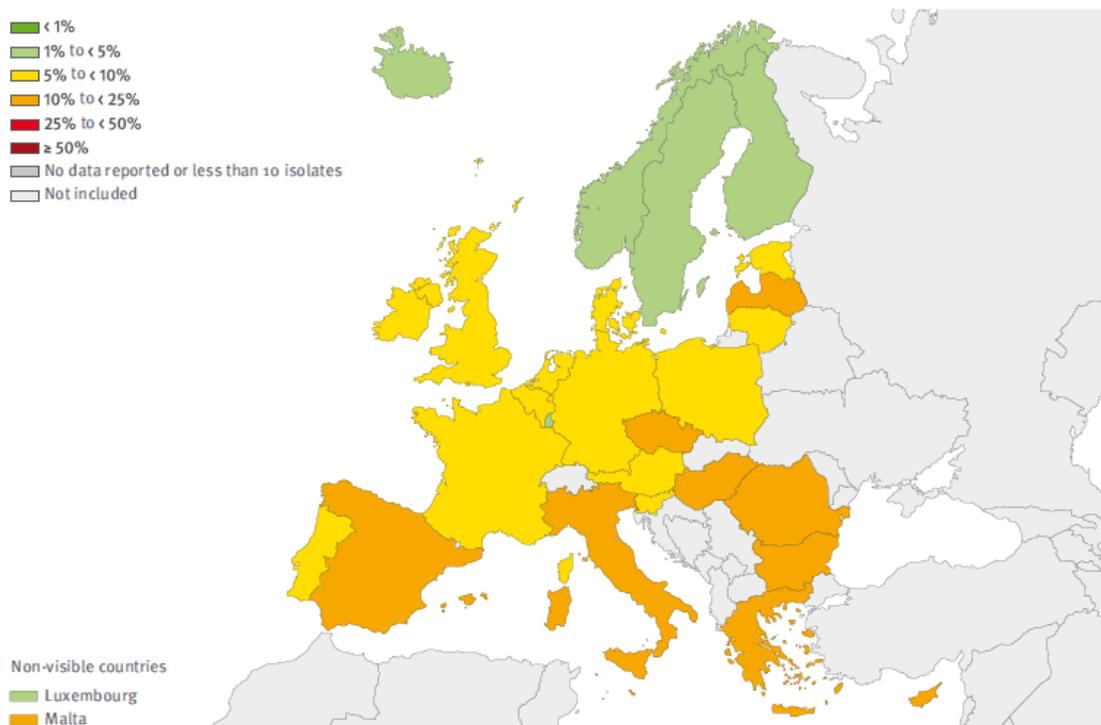


Schéma 34 : Prévalence des souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération en Europe en 2010 [14]

1. Les entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE)

Les β -lactamases à spectre étendu (β LSE) sont des enzymes, de type pénicillinase, qui hydrolysent toutes les bétalactamines même les C₃G¹, excepté les inhibiteurs de bétalactamases, les céphamycines et les carbapénèmes. Leur support étant plasmidique, elles sont transférables de bactérie à bactérie, de même espèce ou d'espèces différentes. Elles sont souvent associées à des résistances à d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides et les fluoroquinolones.

Les entérobactéries sécrétrices de β LSE sont classiquement responsables d'infections nosocomiales en milieu hospitalier, mais un type particulier de souches β LSE émerge dans la communauté : les β LSE dites CTX-M (CTX pour Céfotaxime) qui concernent principalement des souches de *E. coli*. Elles entraînent une hydrolyse préférentielle du Céfotaxime parmi les C₃G. Une pandémie mondiale est décrite depuis quelques années et commence à poser des problèmes thérapeutiques dans la communauté (schéma 35).

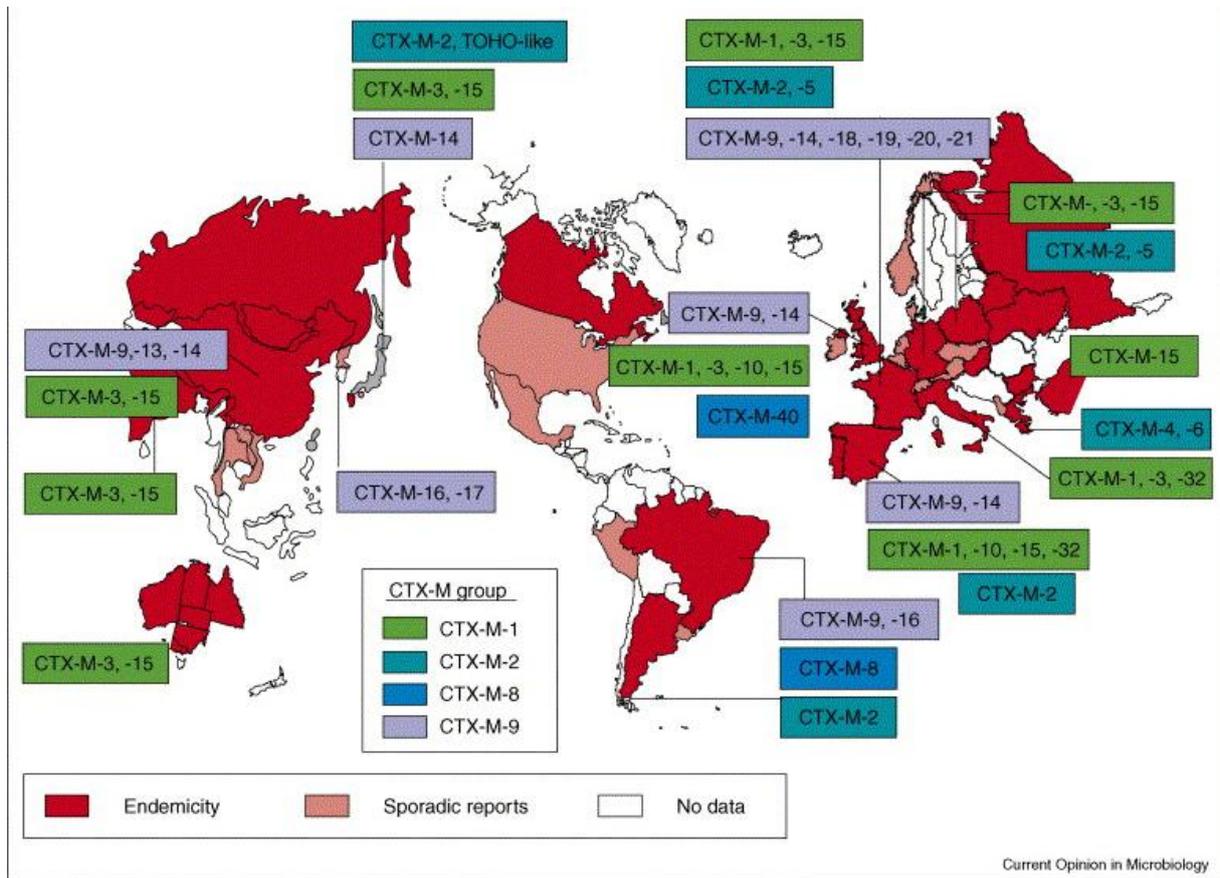


Schéma 35 : Prévalence mondiale des souches d'*E. coli* CTX-M dans le monde en 2006 [7]

Des études ont démontré, en 2010, que la majorité des phénotypes de multirésistance des souches de *K. pneumoniae*, observées en Europe, était médiée par la sécrétion de β LSE, alors que les phénotypes de résistance des souches de *E. coli* étaient plus varié (β LSE et Hyperproduction de céphalosporinase). [7]

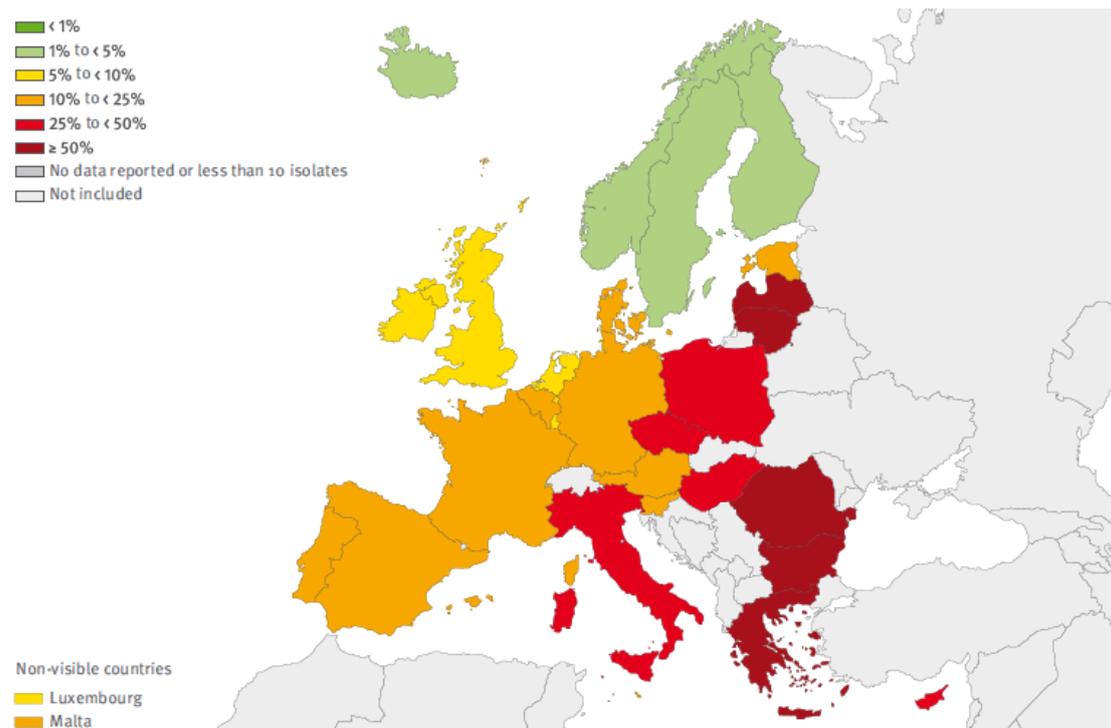


Schéma 36 : Prévalence des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération en 2010 [14]

2. Entérobactéries résistantes aux β - lactamines par hyperproduction de céphalosporinases (EBCASE)

Un certain nombre d'entérobactéries sont naturellement résistantes à l'amoxicilline, à l'association amoxicilline - acide clavulanique et à la céfalotine (+/- certaines céphalosporines de 2^{ème} génération) par sécrétion d'une céphalosporinase chromosomique.

Cette céphalosporinase est codée par le gène *ampC*. La production de cette enzyme est sous le contrôle d'un système régulateur inductible codé principalement par deux gènes : *ampD*, *ampR*.

Le niveau d'expression du gène *ampC* est contrôlé par le gène *ampR*, répresseur. A l'état normal, le niveau d'expression de la céphalosporinase est faible. Une augmentation transitoire et réversible de la production de la céphalosporinase peut être observée en présence d'antibiotiques inducteurs comme la céfoxitine ou l'imipénème.

La protéine AmpD est une amidase cytosolique active lors du recyclage des produits de dégradation du peptidoglycane, les mucopeptides. *E. coli*, comme toute entérobactérie, recycle jusqu'à 50% des composants de son peptidoglycane à chaque génération bactérienne. AmpD a un effet inhibiteur sur AmpR. Des mutations dans la protéine AmpD aboutissent à l'hyperproduction constitutive d'AmpC par levée de l'inhibition du répresseur AmpR.

Cette sécrétion peut être augmentée alors d'un facteur d'environ 1000. Ces souches mutantes deviennent alors résistantes aux céphalosporines de 2^{ème} et de 3^{ème} génération. Seul le Céfépime, parmi les céphalosporines, reste actif.

3. Entérobactéries sécrétrices de carbapénémases

Elles sont diverses, appartenant à la famille des métallo-enzymes ou des pénicillinases (comme les KPC¹) ou des oxacillinases (Oxa-48). [6]

Les carbapénémases hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes. Leur support étant plasmidique, elles sont transférables de bactérie à bactérie.

Leur description initiale date des années 1990 mais était géographiquement limitée au Japon. Aujourd'hui ces souches se sont propagées dans le monde, la Grèce étant le pays d'Europe le plus touché en 2010 (schéma 37).

Leur détection au laboratoire est difficile, surtout pour les Oxacillinases de type Oxa-48, qui touche peu les C₃G.

¹ KPC : *Klebsiella pneumoniae* sécrétrices de carbapénémase

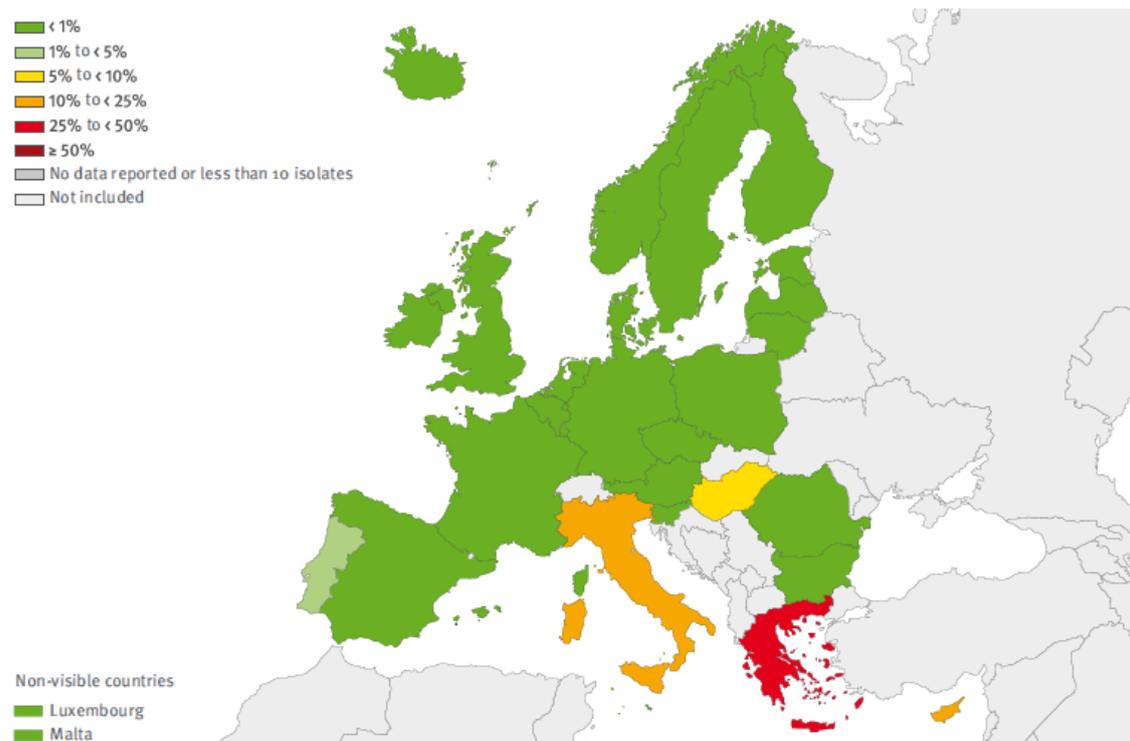


Schéma 37 : Prévalence des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes de type KPC en Europe en 2010 [14]

E. *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants : PAR

P. aeruginosa, appelé aussi bacille Pyocyanique, est l'un des pathogènes majeurs chez les patients immunodéprimés, et est responsable de pneumonies chez les patients intubés-ventilés de Réanimation médicale. [1] [21]

En l'absence d'une définition standardisée, on dit qu'une souche de Pyocyanique est multirésistante lorsqu'elle est résistante à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages : les bêta-lactamines hors carbapénèmes, les fluoroquinolones et les aminosides.

Tous ces mécanismes de résistance sont décrits dans le tableau en annexe 9.

F. Acinetobacter baumannii multirésistant : ABR

A. baumannii est un agent pathogène quasi-exclusivement hospitalier. Il est à l'origine, comme le *Pyocyanique*, de pneumonies chez les patients intubés-ventilés de Réanimation médicale, mais aussi d'infections sur cathéters et de septicémies chez les patients immunodéprimés. [21]

La résistance de cette espèce bactérienne n'a pas non plus de définition consensuelle. Elle inclut néanmoins une résistance aux carbapénèmes type Imipénème ou Méropénème.

Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes est la sécrétion de carbapénémases de type oxacillinases qui peuvent être quasi-spécifiques d'*A. baumannii*.

Cette multirésistance diffuse très rapidement et dans le monde entier. Une fois établie, elle ne régresse pas spontanément. Il est donc important de dépister et de contrôler les porteurs sains comme les malades infectés par ces souches afin de limiter au maximum leur dissémination.

Troisième partie

**Dépistage et méthodes de détection
des BMR au laboratoire de
bactériologie du CHU de Limoges**

I. Dépistage des BMR

A. Intérêt du dépistage

Les bactéries multirésistantes peuvent être à l'origine d'épidémies hospitalières et d'infections nosocomiales. Celles-ci sont, par définition, des infections contractées à l'hôpital qui ne se manifestent que dans un délai supérieur à 48 heures après l'admission du malade. [17]

Les BMR sont responsables de 20 à 30 % de ces infections nosocomiales. La prévalence de leur résistance dans un établissement de santé ou unités de soins est liée à :

- la pression de sélection exercée par l'usage des antibiotiques. Elle est individuelle car elle ne concerne que le patient porteur,
- la dissémination de la multirésistance par transmission manuportée : lors des soins et examens ou par le mouvement des malades (réadmissions, transferts entre hôpitaux, circulation dans les services), pouvant donner lieu à des épidémies hospitalières.

La pression de sélection, exercée par les antibiotiques, favorise l'émergence de mutations chromosomiques ponctuelles conférant une résistance, comme par exemple une céphalosporinase dérégulée, sans recours à l'acquisition de matériel génétique exogène. La prévention de l'émergence de ces résistances repose sur une meilleure utilisation des antibiotiques.

La dissémination de la multirésistance repose sur l'intégration d'éléments génétiques mobiles, qu'ils soient de support chromosomiques (SARM) ou plasmidiques (EBLSE), et dont la possibilité de survenue au niveau individuel est extrêmement faible. La diffusion de ces BMR, liée au manuportage, est limitée par les mesures d'hygiène renforcées comme l'utilisation de Solution HydroAlcoolique (SHA) ou l'isolement du patient. [17]

Ce risque d'épidémies liées aux BMR rend compte des interactions étroites entre infections nosocomiales et antibio-résistance. C'est pourquoi, pour être efficace, une

politique de maîtrise des BMR doit distinguer celles qui diffusent par manuportage et qui répondent aux procédures d'hygiène renforcée de celles qui émergent sous pression de sélection des antibiotiques et qui répondent mal aux procédures d'hygiène renforcée.

B. Politique de dépistage des BMR

En avril 2009, la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH) a émis, dans le cadre de la prévention de la transmission croisée, des recommandations nationales, dont voici les principaux messages :

- il est fortement recommandé que le CCLIN (Centre de Coordination des actions de Lutte contre les Infections Nosocomiales) définisse la politique de dépistage des micro-organismes et actualise régulièrement cette politique,
- il est fortement recommandé d'avoir une stratégie de dépistage adaptée à chaque secteur de soins, la situation épidémiologique d'un service pouvant justifier une stratégie spécifique,
- il est fortement recommandé, en situation épidémique, que le micro-organisme en cause puisse faire l'objet d'une stratégie de dépistage, quel que soit son phénotype de résistance,
- il est fortement recommandé de privilégier le dépistage des agents infectieux à « haut potentiel de transmission croisée », dont les BMR pour lesquels la transmission croisée joue un rôle essentiel, le meilleur exemple étant le SARM. *A contrario*, il est fortement recommandé de ne pas privilégier le dépistage des BMR sous la dépendance principale de la pression de sélection, notamment les entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinases,
- il est fortement recommandé de mettre en place une surveillance épidémiologique des agents infectieux « à haut potentiel de transmission croisée » dont les BMR.

Ces recommandations laissent donc libre choix à chaque établissement, *via* le CLIN, de mettre en œuvre sa politique de dépistage, adaptée au mieux à chaque secteur de soins.

Quelques recommandations supplémentaires sont à noter pour certaines BMR. En effet, concernant les EBLSE, leur dépistage est recommandé uniquement en cas de contact d'un patient ou en cas d'endémie.

D'autre part, pour les ERV, un avis du Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) recommande, depuis 2010, la recherche de ces bactéries digestives commensales chez les personnes rapatriées de l'étranger ou ayant fréquenté le système de santé de pays ayant des fréquences élevées de ces bactéries. Une nouvelle version de ce rapport a étendu les recommandations aux patients ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois précédents. Ces recommandations ont été récemment confirmées par une circulaire de la Direction Générale de la Santé (DGS) pour les entérobactéries productrices de carbapénémases. [9]

Pour le dépistage des ERV, il est principalement réalisé dans un contexte épidémique. Il peut néanmoins être mis en œuvre chez des patients très immunodéprimés tels que les sujets neutropéniques¹ ou aplasiques².

Enfin, la recherche de portage nasal de *S. aureus* est recommandée chez les sujets hémodialysés en raison d'un risque accru d'infections invasives à partir de cathéters colonisés. [12]

C. Recommandations pour la maîtrise de la diffusion des BMR

Ces mesures préventives s'appliquent aux disséminations de germe par transmission croisée. [17]

La politique de maîtrise des bactéries multirésistantes implique la mise en place de procédures d'isolement de type contact. Il vise à rompre la chaîne de transmission par manuportage. Ces procédures ont été élaborées dans un premier temps pour les services de réanimation où elles ont prouvé leur grande efficacité puis ont été appliquées aux services de soin.

Ces recommandations associent plusieurs mesures d'isolement.

¹ Sujets neutropéniques : sujet présentant une baisse des polynucléaires neutrophiles sanguins

² Sujets aplasiques : sujet présentant une diminution de toutes les lignées sanguines : les globules rouges, les plaquettes et les globules blancs

- L'isolement géographique : le but est de regrouper les patients porteurs du même type de BMR dans un secteur, avec un personnel et un matériel dédiés. Cette action est très efficace mais entraîne une réorganisation du service et une surcharge de travail non négligeable.
- L'isolement technique : le personnel et le matériel doivent être dédiés. En effet, le patient doit avoir un personnel, dans la mesure du possible, présent que sur son secteur contaminé avec un matériel qui lui est propre (à usage unique de préférence). Cela concerne aussi le stéthoscope, le brassard à tension, les sangles de pesée. Si le matériel est partagé, il devra être méticuleusement nettoyé entre deux patients.
- La signalisation : c'est un élément important de l'information. Des logos peuvent être collés sur le résultat bactériologique, le dossier, la porte du patient. Une fiche de liaison peut aussi être annexée pour permettre d'informer sur les recommandations élaborées localement (annexe 10).

Ainsi, la maîtrise des BMR doit, nécessairement, associer des procédures d'hygiène strictes pour lutter contre les transmissions croisées et une politique de bon usage des antibiotiques visant à minimiser, autant que possible, la pression de sélection.

D. Au CHU de Limoges

Prenons l'exemple du CHU de Limoges pour décrire le protocole de dépistage choisi. Celui-ci dépend du service de soins concerné et de la situation épidémique dans l'établissement.

Pour les patients hospitalisés en service de Médecine, de Chirurgie, en Réanimation polyvalente ou chirurgicale, aucun dépistage systématique de BMR n'est réalisé. Les mesures d'isolement sont mises en place seulement après identification d'une BMR dans un prélèvement clinique.

Pour les services d'Hématologie, d'Onco-hématologie pédiatrique, de Néphrologie et d'Oncologie, un dépistage systématique à l'entrée et de façon hebdomadaire est

réalisé. Dans les services de Réanimation d'Hématologie et d'Onco-hématologie pédiatrique, les patients sont traités par des chimiothérapies ayant pour effets secondaires une immunodépression profonde et une mucite¹ qui rompt l'effet de barrière de la muqueuse digestive. Ainsi toute colonisation digestive peut être source de translocation sanguine.

Au service de Néphrologie, les patients concernés par ce dépistage sont les patients transplantés rénaux. En effet, l'utilisation d'immunosuppresseurs dans cette population entraîne une immunodépression, mais aussi, une aplasie de la muqueuse digestive, ayant a priori les mêmes conséquences que la mucite.

Les bactéries ciblées, lors de ce dépistage, concernent :

- les BMR : pour leurs difficultés thérapeutiques en cas d'antibiothérapie probabiliste instituée devant tout épisode infectieux,
- les souches de bacilles pyocyaniques (*P. aeruginosas*) : pour leur virulence car bien que responsables de seulement 5% des bactériémies en Hématologie, celles-ci entraînent 50% de mortalité,
- les souches de *S. aureus* : pour leur virulence propre et leur tropisme particulier pour les cathéters centraux, très utilisés dans les services précités.

II. Détection des BMR

A. Les sites de prélèvement

Le prélèvement d'au moins 2 sites est en général admis. Les sites les plus utilisés sont les sites nasal et anal, En effet, les BMR colonisent, préférentiellement, les muqueuses nasales (c'est le cas des souches de *S. aureus*) et rectales (c'est le cas des BMR entériques : ERC, PARC, ERV).

¹ Mucite : inflammation et ulcération des muqueuses le long du tube digestif. Elle se localise, le plus souvent, au niveau buccal, donnant lieu à des aphtes.

Des échantillons supplémentaires peuvent être indiqués dans certaines situations spécifiques telles que les prélèvements trachéaux chez les patients trachéotomisés et/ou ventilés, ou encore les prélèvements cutanés, en particulier sur les plaies chroniques pour la recherche de *S. aureus* et d'*A. baumannii*.

Au CHU de Limoges, le dépistage repose sur un prélèvement nasal, un prélèvement de gorge et une coproculture.

B. Milieux sélectifs des BMR

Plusieurs méthodes diagnostiques sont mises à disposition des laboratoires de biologie médicale. Un large choix d'outils est offert, parmi lesquels des milieux de culture spécifiques, des tests de diagnostic immunologiques, des outils de biologie moléculaire avec la PCR en temps réel, etc.

Les milieux de culture chromogéniques¹ (ou milieux chromogènes) sont des outils diagnostiques clés. Leur principe est basé sur la mise en évidence d'une activité enzymatique spécifique de la bactérie ciblée. En effet, un substrat chromogène est dégradé par l'enzyme bactérienne en un composé coloré ; les colonies sont ainsi facilement reconnaissables sur la gélose. La composition de ces milieux n'est pas toujours connue en raison de brevets déposés par les industriels. D'une façon générale, ces milieux ne doivent pas être exposés à la lumière et sont incubés à 37°C sans apport de CO₂. Les durées d'incubation varient de 24 heures à plus de 50 heures. [12]

¹ Milieux chromogéniques : milieux de culture permettant de mettre en évidence une enzyme spécifique d'une espèce bactérienne.

C. Détection des BMR au laboratoire du CHU de Limoges

Les outils de dépistage, utilisés au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges, sont divers. Des méthodes de détection manuelles ainsi que des méthodes de détection automatisées sont mises en pratique.

1. Méthodes de détection manuelles

Pour le dépistage des bactéries entériques, une coproculture est adressée au laboratoire du CHU de Limoges. Ce prélèvement est ensemencé sur les milieux COS, chromID VRE et AES β LSE.

- COS (schéma 38) : Ce milieu correspond au milieu columbia (annexe 11), auquel a été additionné du sang de mouton à raison de 5 %. Cette gélose permet d'obtenir une image de la richesse de la flore entérique. Ainsi, tout monomicrobisme est à considérer dans un prélèvement attendu très polymorphe. Ce milieu permet aussi de mettre en évidence des colonies β hémolytiques¹ (*S. aureus* mais aussi Streptocoques de groupe A, B, C, ou G).

¹ Colonies β hémolytiques : Colonies provoquant une β hémolyse ; destruction des globules rouges formant un halo autour des colonies

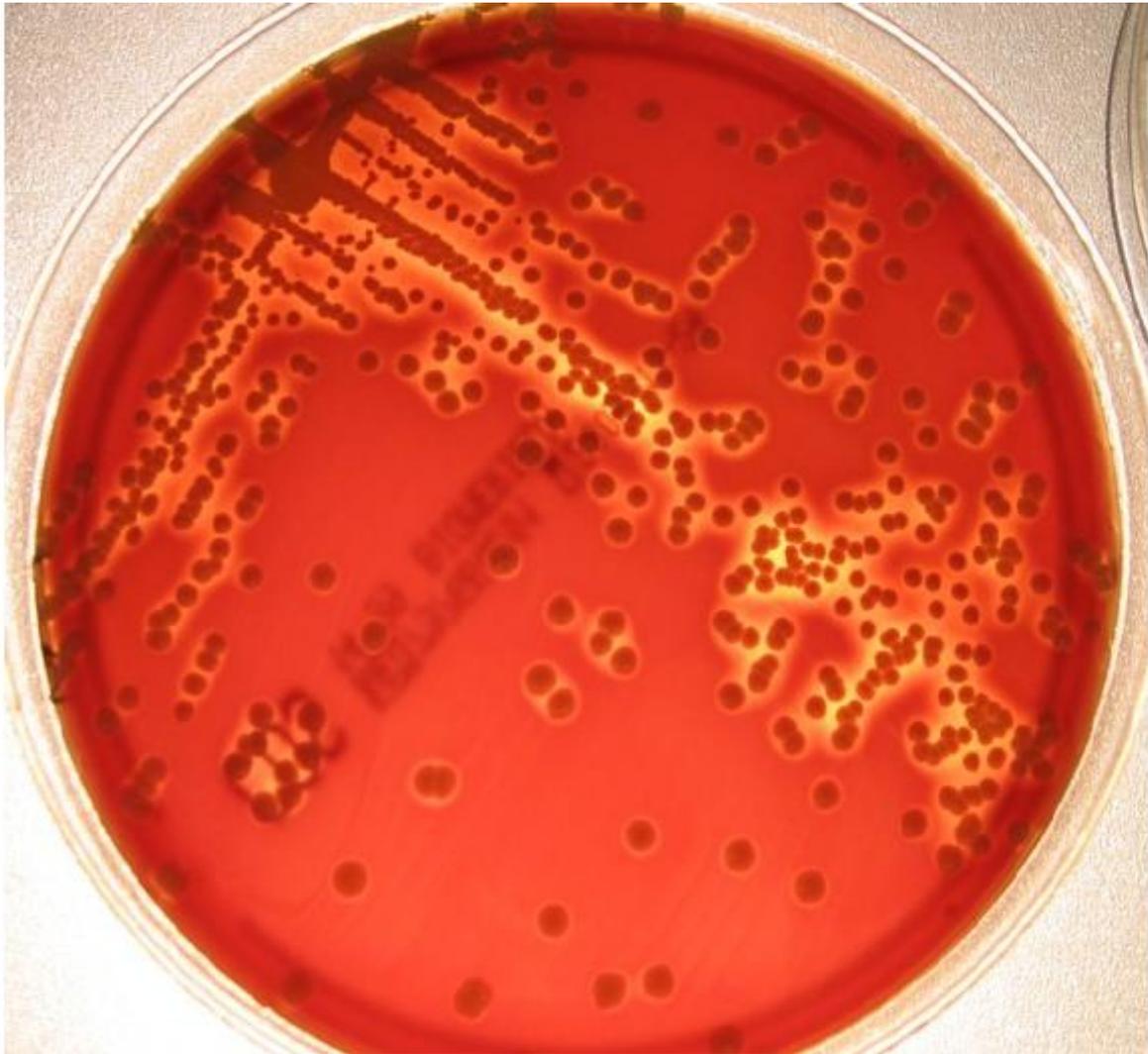


Schéma 38 : COS ensemencée avec une souche de *S. aureus*, β hémolytique

- ChromID VRE (schéma 39) : ce milieu chromogène permet le dépistage rapide et fiable des souches d'*E. faecium* et *E. faecalis* présentant une résistance acquise à la vancomycine. Ce milieu contient deux substrats chromogènes : α -glucosidase et β -galactosidase, ainsi que 8 mg/l de vancomycine permettant :
 - la croissance spécifique et sélective des ERV : inhibition des Entérocoques présentant une résistance naturelle à la Vancomycine (*E. casseliflavus* et *E. gallinarum*), et la plupart des bactéries à Gram négatif, à Gram positif, les levures et les moisissures,

- l'identification directe des souches d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* après 24 heures d'incubation puisque, pour chaque genre, une coloration spécifique des colonies sera observée : la couleur « bleu-vert » est caractéristique d'*E. faecalis* et le violet d'*E. faecium*.

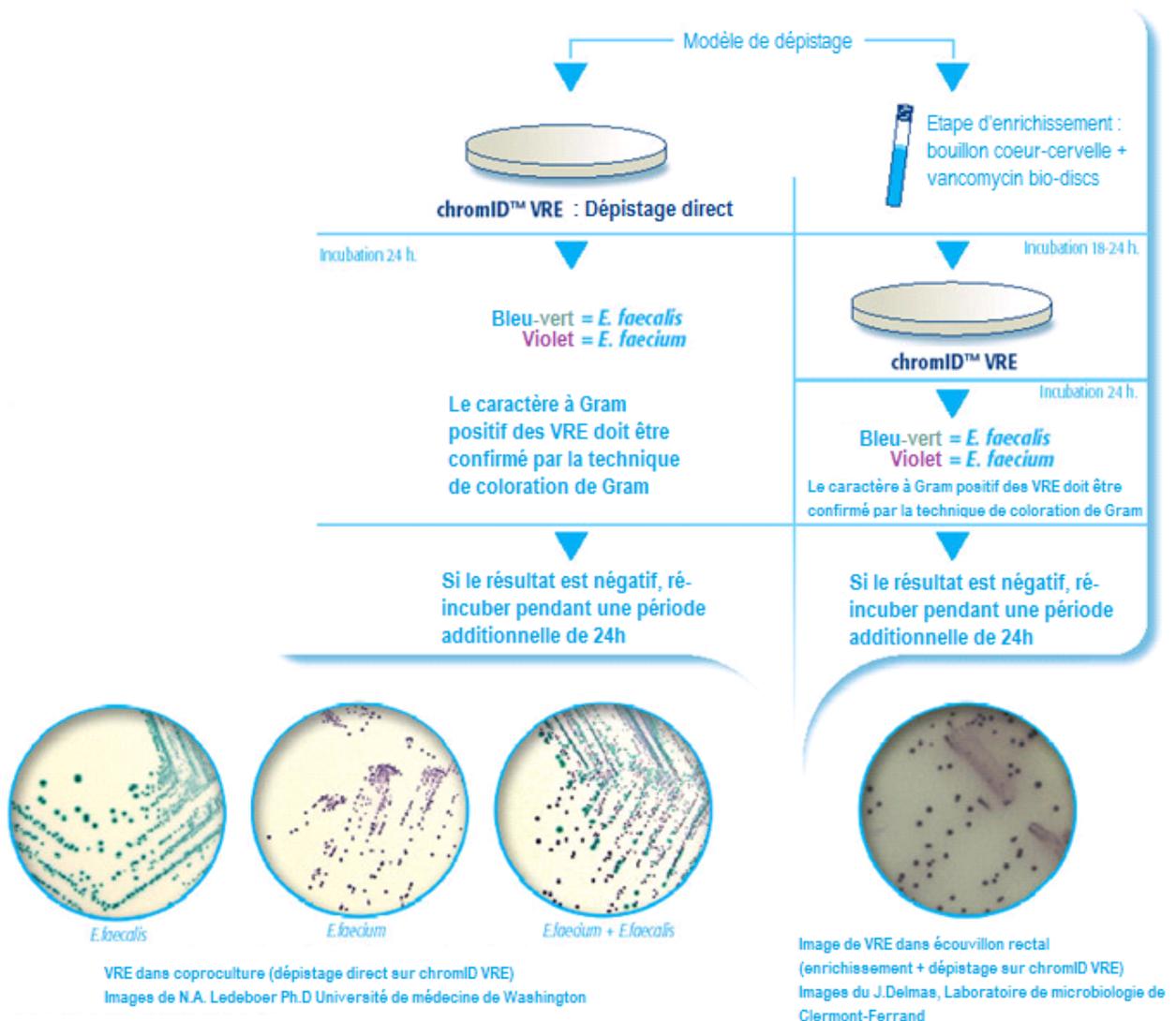


Schéma 39 : Notice du fournisseur (bioMérieux®) pour l'utilisation des chromID VRE

- β LSE (AES) (schéma 40) : ce milieu permet le dépistage des entérobactéries résistantes aux deux céphalosporines de 3^{ème} génération que sont la Ceftazidime et le Céfotaxime. Il s'agit d'une bi-boîte contenant : d'un côté Mac Conkey + Ceftazidime et de l'autre Drigalski + Céfotaxime (annexe 11).

Cette gélose permet de détecter, entre autres, les entérobactéries sécrétrices de β LSE et celles productrices de céphalosprinasés déréprimés.

Les souches de Pyocyaniques, naturellement résistantes au Céfotaxime, sont isolées sur la bi-boîte côté Drigalski + Céfotaxime.



Schéma 40 : β LSE (AES)

Après identification, un antibiogramme est réalisé. Il permet d'établir le phénotype de résistance aux antibiotiques en cas de nécessité d'antibiothérapie curative.

Au laboratoire de bactériologie, l'antibiogramme s'effectuera sur deux géloses de Mueller-Hinton (MH) de 120 millimètres de diamètre, avec 32 disques d'antibiotiques différents.

Voici quelques exemples de phénotypes rencontrés dans le cadre de la recherche de BMR.

- ❖ **Pour une β LSE** : elle est affirmée par la présence d'une image en « bouchon de champagne », qui est une image de synergie entre une céphalosporine de 3^{ème} génération et l'acide clavulanique (schéma 41).

En effet, l'acide clavulanique est un inhibiteur en présence d'une β LSE.

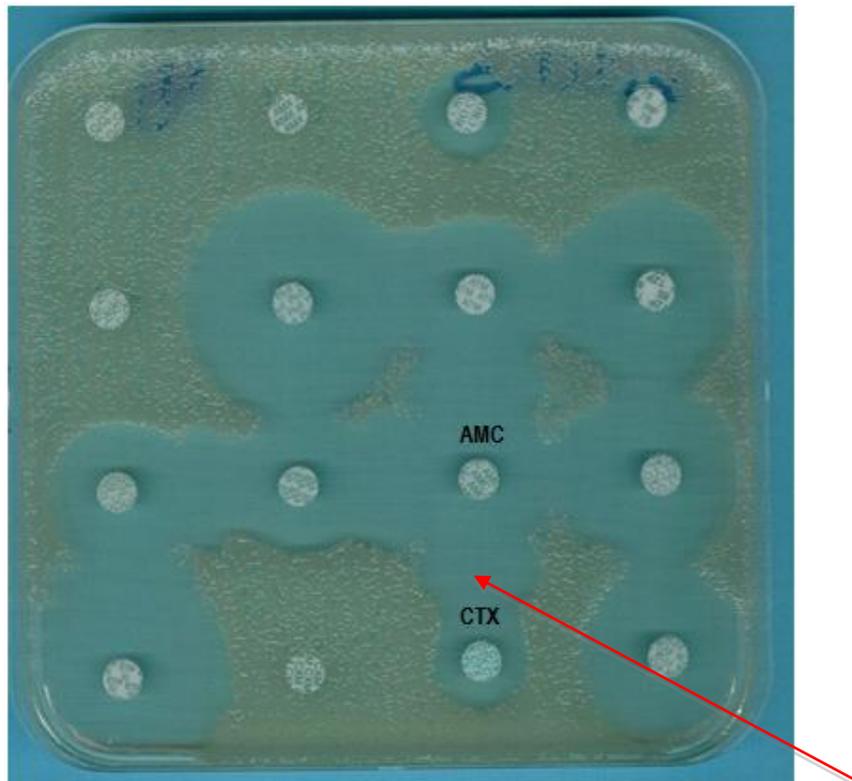


Schéma 41 : Antibiogramme d'une souche de *E. coli* mettant en évidence une β LSE
(« bouchon de champagne »)

❖ **Pour les céphalosporinases dérprimées** : elles sont affirmées lorsqu'il est observé :

- ✓ l'absence d'activité de l'acide clavulanique,
- ✓ l'absence de « bouchon de champagne »,
- ✓ la conservation totale ou partielle de l'activité du céfépime,
- ✓ la présence d'image d'antagonisme en regard des inducteurs que sont l'imipénème, la céfoxitine ou l'acide clavulanique (aplatissement des diamètres d'inhibition)
- ✓ la réversion au moins partielle du phénotype de résistance sur une gélose contenant 250 mg/L de cloxacilline, inhibiteur de céphalosporinase.

Voici l'exemple d'une souche d'*E. coli*, présentant une céphalosporinase dérprimée pour laquelle une réversion partielle des résistances au céfépime et à la ceftazidime est visible sur la gélose à la cloxacilline (schéma 42).

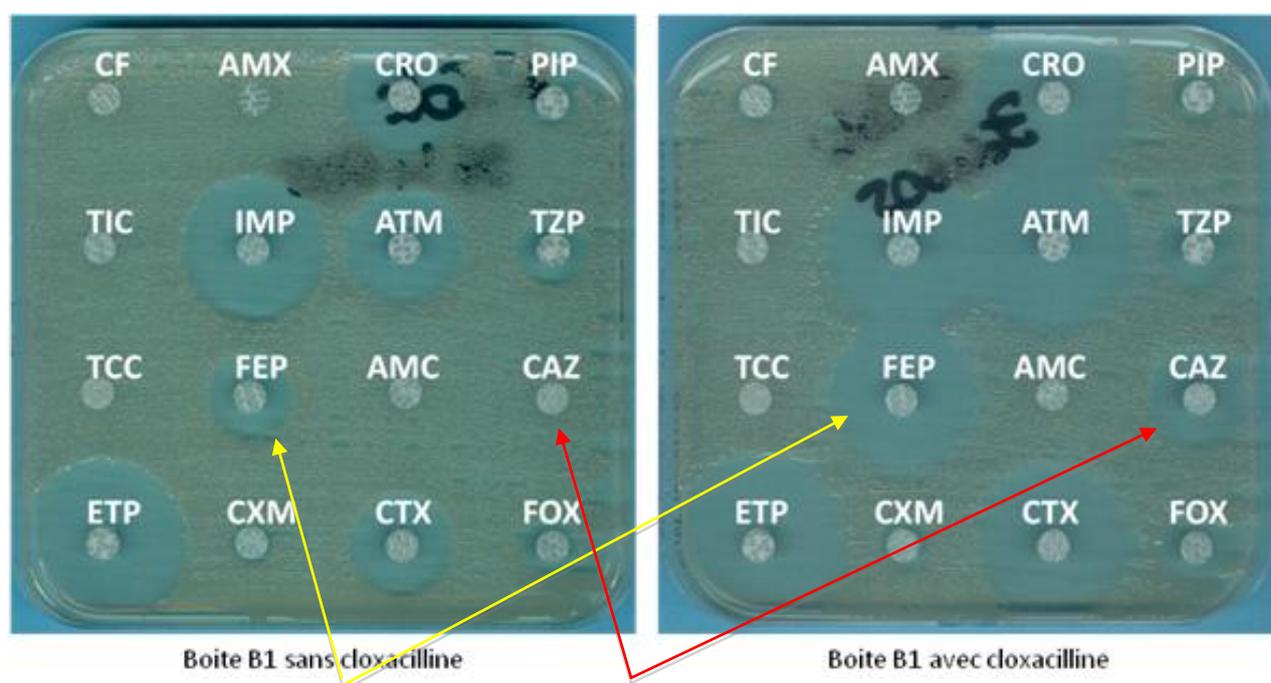


Schéma 42 : Céphalosporinase dérprimée chez une souche d'*E. coli* avec réversion partielle des résistances en présence de cloxacilline

Il arrive, quelquefois, qu'une souche puisse cumuler ces deux mécanismes de résistance. Prenons l'exemple d'une souche d'*E. cloacae* avec une céphalosporinase dérégulée et une β LSE (schéma 43).

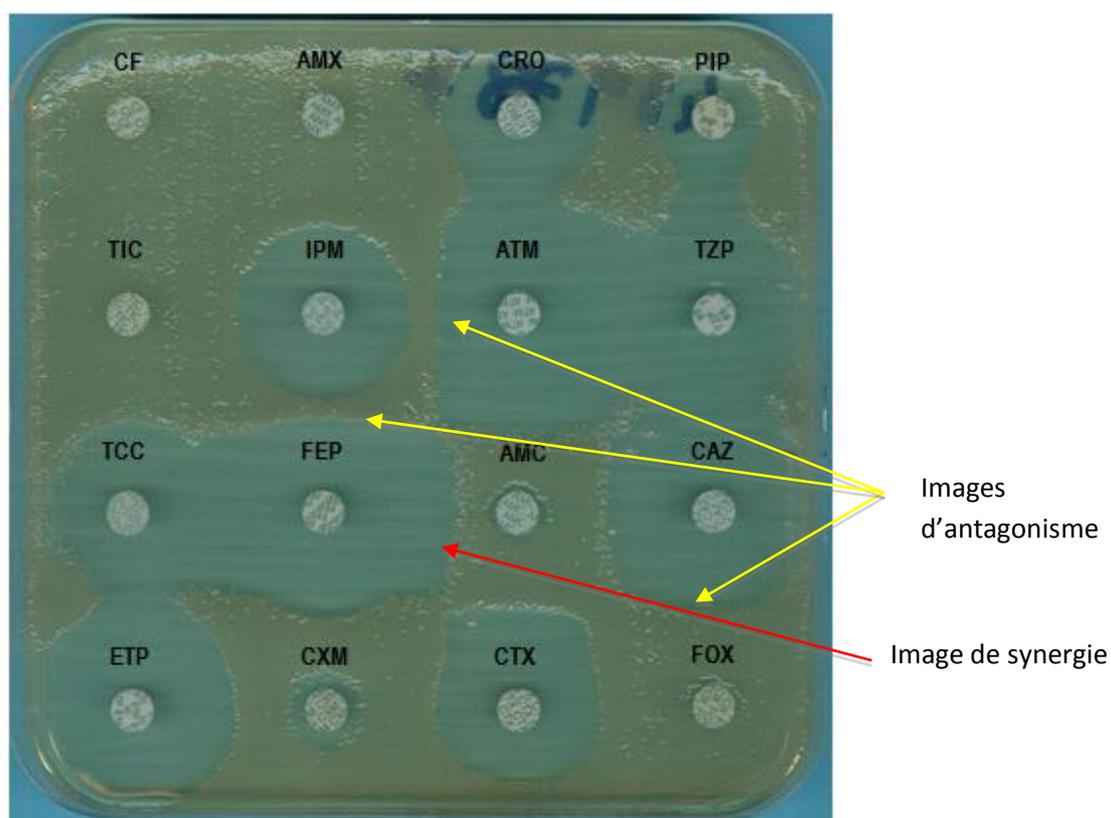


Schéma 43 : Céphalosporinase dérégulée et β LSE de bas niveau chez une souche d'*E. cloacae*

Nous pouvons constater quelques images d'antagonisme entre l'imipénème, inducteur, et deux autres β -lactamines, le céfépime et l'aztréonam. De même, en regard de la céfoxitine et de l'acide clavulanique, des images d'antagonisme sont présentes, avec des zones d'inhibition en lignes droites et non plus circulaires.

La présence d'une β LSE peut être suspectée devant une image de synergie en regard du Céfépime avec ébauche de « bouchon de champagne ».

Un deuxième antibiogramme est alors réalisé sur une gélose à la cloxacilline. Cela doit permettre de mettre clairement en évidence une β LSE par inhibition de la céphalosporinase dérégulée (schéma 44).

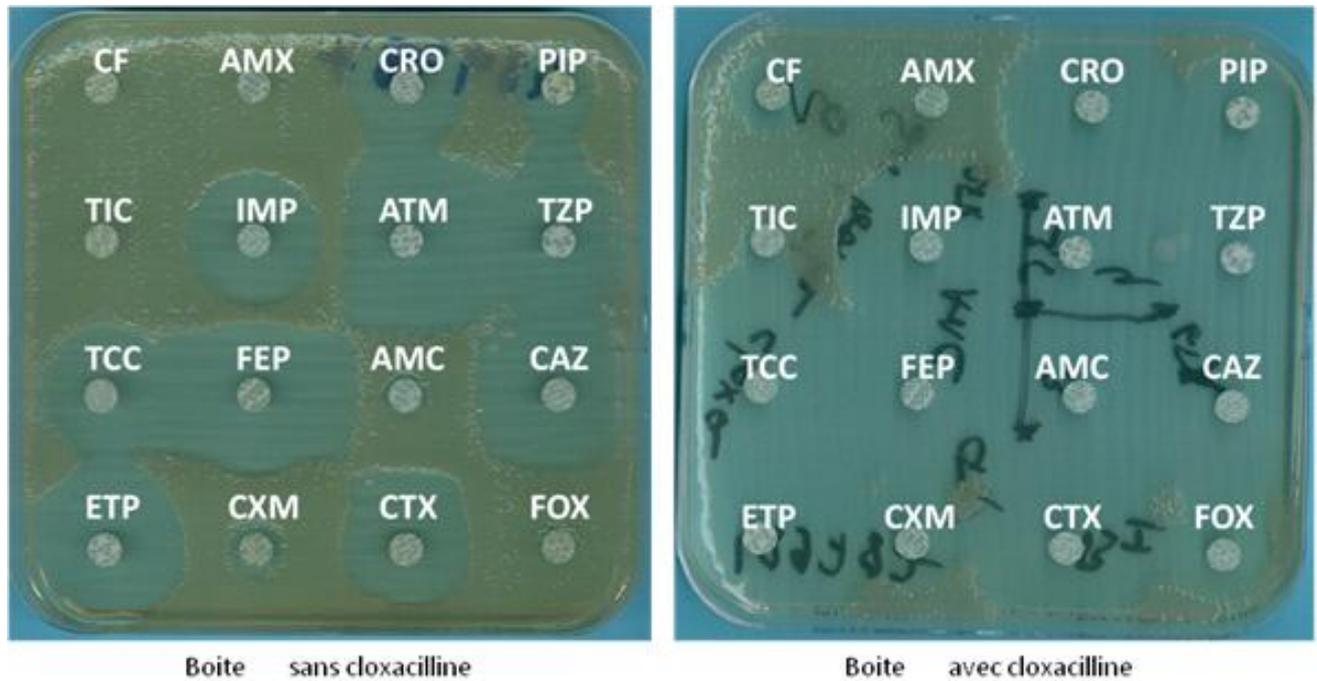


Schéma 44 : Céphalosporinase dérégulée avec réversion des résistances sur gélose à cloxacilline et absence d'images évocatrices de β LSE chez une souche d'*E.cloacae*

Sur la gélose à la cloxacilline, la présence de la β LSE n'est pas évidente du fait de son faible niveau d'excrétion.

Il est recommandé alors d'éloigner les disques de C₃G et d'amoxicilline + acide clavulanique pour mettre en évidence les images de synergie (schéma 45). La distance de centre à centre des disques doit être supérieure à 3 cm.

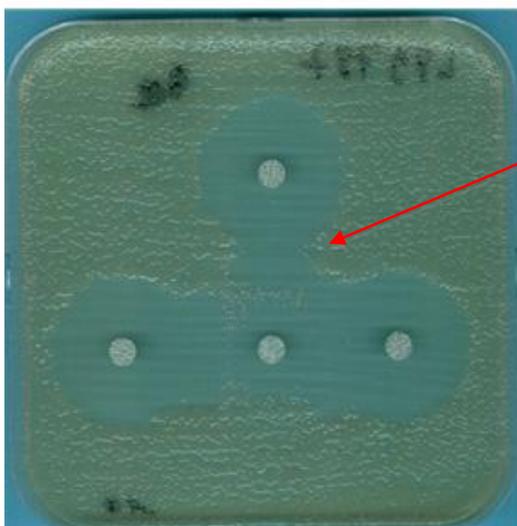


Image de synergie entre AMC et CTX

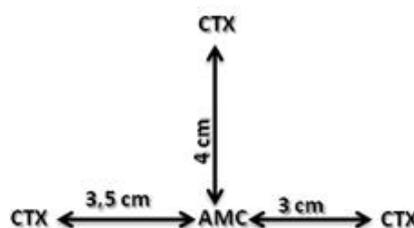


Schéma 45 : Test de synergie sur gélose à cloxacilline chez une souche d'*E. cloacae*

2. Méthodes de détection automatisées

Cette partie décrit le système automatisé VITEK® 2 utilisé dans le laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges.

Le VITEK® 2 est un automate de microbiologie, proposé par l'industriel bioMérieux®. Il est disponible en trois formats : VITEK® 2 Compact, VITEK® 2 et VITEK® 2 XL. Ces derniers diffèrent selon des niveaux croissants de capacité et d'automatisation. [22]

Le laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges possède deux automates VITEK® 2 (schéma 46) pour assurer la réalisation des antibiogrammes de routine. Cet appareil permet d'obtenir, rapidement, des résultats d'identification bactérienne et d'antibiogramme avec une expertise du phénotype. En effet, ce type d'appareil est conçu pour les petits et moyens laboratoires souhaitant disposer d'un système automatisé capable de traiter la majorité de leurs tests de routine avec un rendu de résultats rapide.



Schéma 46 : VITEK® 2. Automate présent au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges.

De plus, cet automate présente un poste de travail délocalisé, qui permet de préparer l'inoculum à la paillasse (schéma 47).

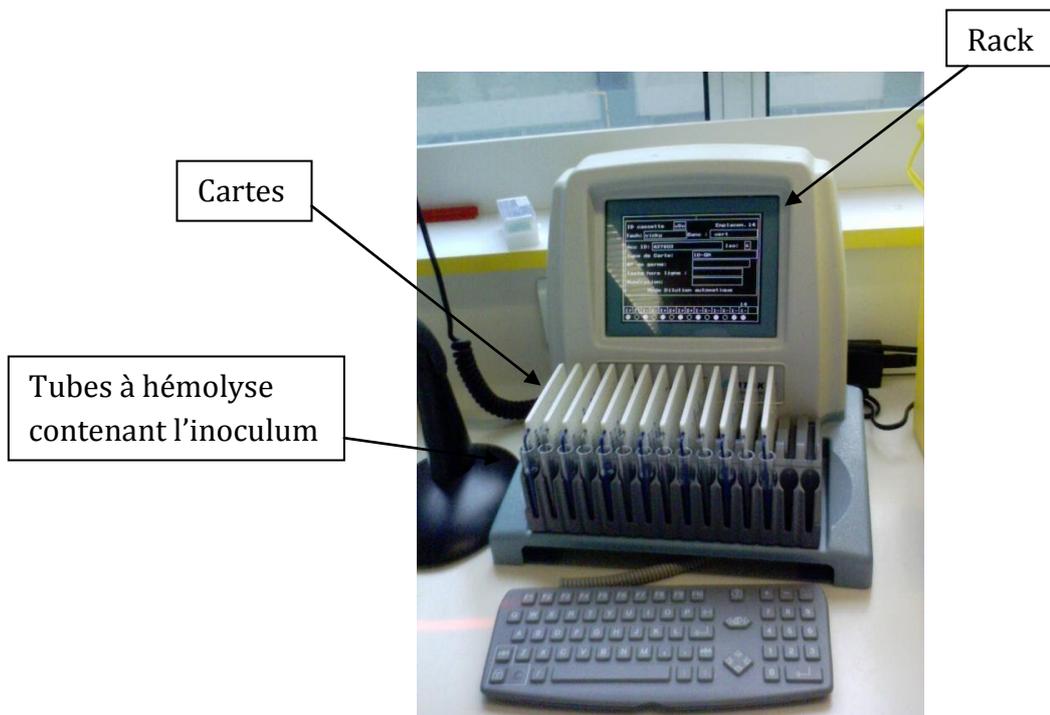


Schéma 47 : Poste délocalisé relié au VITEK® 2 disposé sur la paillasse

Cet automate fournit également une option de pipetage automatique et de dilution pour les tests de sensibilité aux antibiotiques.

L'étape d'identification nécessite l'utilisation de cartes réactives. Celles-ci permettent de mesurer diverses activités métaboliques comme l'acidification, l'alcalinisation, l'hydrolyse enzymatique, etc... Au laboratoire de bactériologie de Limoges seules deux cartes sont utilisées :

- ✓ GN - bacilles à Gram négatif fermentants et non fermentants,
- ✓ GP - cocci à Gram positif et bacilles non sporulés.

L'antibiogramme vient, ensuite, compléter l'étape d'identification. Le VITEK® 2 est équipé d'un logiciel pour la validation des tests de résistance aux antibiotiques et l'interprétation des résultats. Il s'agit du logiciel Advanced Expert System (AES™). Il permet d'identifier les mécanismes de résistances bactériennes, les plus courants, voire les résistances émergentes ou de bas niveau. [4]

Quatre cartes d'antibiogramme sont disponibles. Il existe deux cartes pour les bactéries à Gram positif (une carte pour les staphylocoques et une carte pour les streptocoques)

et deux cartes pour les bactéries à Gram négatif (une carte pour les entérobactéries et une carte pour les bactéries non fermentantes).

Chaque carte contient environ 20 antibiotiques testés à différentes concentrations et un témoin de croissance. Ainsi lors de l'incubation, le VITEK va mesurer la croissance bactérienne dans les puits de contrôle et les puits contenant les antibiotiques à différentes concentrations. Il déterminera alors le niveau de résistance de la bactérie à chaque antibiotique. Ces niveaux sont corrélés aux catégorisations « sensible », « intermédiaire » ou « résistant » rendues au prescripteur.

Quatrième partie

**Problématique rencontrée au
laboratoire de bactériologie au CHU
de Limoges**

Comme tout automate, le VITEK® 2 présente quelques imperfections.

En effet, certaines erreurs d'interprétation de phénotype de multirésistance ont été notées au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges par les microbiologistes. Elles concernaient des souches du genre *Enterobacter* spp, soient quatre souches d'*Enterobacter cloacae* et une souche d'*Enterobacter aerogenes* (Annexe 12 à 17).

Les quatre souches d'*E. cloacae* ont été isolées dans deux ECBU, un abcès de paroi et une hémoculture. Le VITEK® 2 interprétait le phénotype de résistance secondaire à une céphalosporinase dérégulée.

Les biologistes, devant les co-résistances associées, plutôt rencontrées dans une résistance médiée par des plasmides, ont suspecté une β LSE.

Un contrôle de l'antibiogramme par une autre méthode, soit la diffusion en gélose MH, a été réalisé. Il a mis en évidence la présence de « bouchons champagne » preuve d'une synergie et évocateurs d'une β LSE. L'antibiogramme réalisé en parallèle sur une gélose MH à la cloxacilline a éliminé une céphalosporinase dérégulée associée.

Le cas pour une des souches d'*E. cloacae* isolée le 12 juin 2010 est détaillé.

Voici le résultat rendu par le VITEK® 2 :

Client bioMérieux : 16561
 Référence du système : VTK21485

Rapport du laboratoire

Imprimé 15 juin 2010 10:24 CDT
 Imprimé par

Nom du patient :

*** Alerte activée

ID du patient

Groupe d'isolats : 339938-1

Paillasse : rouge

Profil biochimique : 0627634553533010

Germe sélectionné : *Enterobacter cloacae*

| Résultats Antibiogramme | | Carte : AST-N103 | N° de lot : 413171210 | Péréemption : 22 août 2011 13:00 CDT | |
|---------------------------------|--------|--|--------------------------------|---|----------------|
| | | Terminé le : 12 juin 2010 22:59 CDT | État : Final | Heure de l'analyse : 8,25 heures | |
| Antibiotique | CMI | Interprétation | Antibiotique | CMI | Interprétation |
| Ampicilline | >= 32 | R | Amikacine | 16 | I |
| Amoxicilline/acide clavulanique | >= 32 | R | Gentamicine | >= 16 | R |
| Ticarcilline | >= 128 | R | Nétilmicine | >= 32 | R |
| Pipéracilline/tazobactam | >= 128 | R | Tobramycine | >= 16 | R |
| Céfalotine | >= 64 | R | Acide nalidixique | >= 32 | R |
| Céfoxitine | >= 64 | R | Ciprofloxacine | >= 4 | R |
| Céfotaxime | >= 64 | R | Norfloxacine | >= 16 | R |
| Ceftazidime | 16 | R | Ofloxacine | >= 8 | R |
| Ertapénème | <= 0,5 | S | Nitrofurantoïne | 64 | S |
| Imipénème | <= 1 | S | Triméthoprime/sulfaméthoxazole | >= 320 | R |

+ = Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

| | | | | | |
|-----------------------|-----------------|--|--|---|--|
| Résultats AES : | | Dernière modification : 20 janv. 2010 13:20 CST | | Normes/Phénotype : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES | |
| Niveau de fiabilité : | Concordant | | | | |
| Phénotype : | BÉTA-LACTAMINES | CEPHALOSPORINASE A HAUT NIVEAU (AmpC) | | | |

R : Résistant
 I : Intermédiaire
 S : Sensible

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.01

Norme d'interprétation des CMI : CASFM 2009

Nom du jeu de paramètres AES : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES

Politique d'interprétation thérapeutique : Copie de PHENOTYPIC

Dernière modification du paramètre AES : 20 janv. 2010

13:20 CST

Page 2 / 2

Schéma 48 : Interprétation d'antibiogramme d'une souche d'*E. cloacae* par le VITEK® 2 du laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges

Les souches d'*E. cloacae* ont une résistance naturelle à la céfalotine, l'ampicilline, l'association amoxicilline + acide clavulanique et à la céfoxitine.

Cette souche présente une résistance à la ticarcilline, à l'association pipéracilline + tazobactam, au céfotaxime et à la ceftazidime. Elle reste sensible à l'ertapénème et l'imipénème.

Comme la CMI de l'association pipéracilline/tazobactam (TZP) est supérieure à 128 mg/l, le logiciel d'interprétation AES™ du VITEK® 2 écarte la possibilité d'une β LSE, car celle-ci reste sensible à l'action des inhibiteurs de pénicillinase tels que le tazobactam.

Ce phénotype est évocateur d'une céphalosporinase dérégulée.

Voici maintenant le résultat obtenu par la technique de diffusion en gélose MH :



Schéma 49 : Antibiogramme d'une souche d'*E. cloacae* sur une gélose MH avec et sans cloxacilline

Sur la gélose MH sans cloxacilline, il est possible de constater la présence de « bouchons de champagne » entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de 3^{ème} génération, signant une synergie. Ceci est caractéristique d'une β LSE.

Il est notable qu'aucune image d'antagonisme n'est détectée, et que l'antibiogramme sur gelose MH à la cloxacilline ne modifie pas les diamètres d'inhibition.

Il s'agit donc d'une souche d'*E. cloacae* sécrétrice de β -lactamase à spectre étendu, sans céphalosporinase dérégulée.

Devant le diamètre d'inhibition de l'association de pipéracilline/tazobactam (TZP) catégorisant la souche « sensible », une détermination de CMI par E-test¹ est réalisée.



Schéma 50 : CMI par E-test¹ de la pipéracilline/tazobactam chez la souche d'*E. cloacae*.

La CMI est lue à 12 mg/L, bien plus basse que celle déterminée par le VITEK® 2.

¹ E-test : technique quantitative de détermination de la sensibilité aux antibiotiques sur milieu gélosé (bioMérieux®)

Les résultats obtenus lors des contrôles en méthodes manuelles ne corroborent pas les résultats du VITEK® 2 : l'interprétation du phénotype est fautive et la CMI du TZP est surestimée.

La détermination de la CMI du TZP est importante, pour l'AES™, afin de distinguer les β LSE des céphalosporinases dérégulées. Une CMI de TZP supérieure ou égale à 128 mg/L écarte la β LSE. Ainsi, cette limite de performance a entraîné une erreur d'interprétation de phénotype d'entérobactéries du groupe 3.

Suite à plusieurs réclamations de clients sur ces erreurs de détermination du TZP, modifiant l'interprétation des phénotypes de résistance, le fournisseur bioMérieux® a adressé un courrier à tous les utilisateurs de cet automate dans lequel il annonçait le retrait du TZP dans le rendu des antibiogrammes pour certaines espèces d'entérobactéries (Annexe 18).

Cette disposition obligeait les utilisateurs à tester par une autre méthode (gélose MH avec un disque de TZP) la sensibilité des souches au TZP, si le clinicien la demandait.

Quant à la souche d'*E. aerogenes*, isolée dans une aspiration bronchique, l'interprétation du VITEK® 2 mentionnait un phénotype de résistance de type β LSE. Le biologiste, devant une augmentation modérée de la CMI de la Ticarcilline (alors que cette molécule est particulièrement inactivée en présence d'une pénicillinase ou d'une β LSE), a demandé un contrôle de l'antibiogramme sur gélose MH qui n'a pas mis en évidence de bouchon de champagne. L'antibiogramme sur gélose MH à la cloxacilline montrait une réversion partielle des résistances. Ces données imputaient la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération à une céphalosporinase dérégulée sans β LSE associée.

Voici les résultats obtenus par les différentes techniques :

N° Client bioMérieux : 16561
Référence du système : VTK21481

Rapport du laboratoire

Imprimé 21 juin 2010 11:13 CDT
Imprimé par

Nom du patient

*** Alerte activée ***

ID du patient :

Groupe d'isolats : 340150-1

Paillasse : rouge

Profil biochimique : 6627734453176010

Germe sélectionné : *Enterobacter aerogenes*

| Résultats Antibiogramme | Carte : AST-N103 | | N° de lot : 413171210 | | Péremption : 22 août 2011 13:00 CDT | |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|-------|-------------------------------------|--|
| | Terminé le : 17 juin 2010 23:49 CDT | | État : Final | | Heure de l'analyse : 12,25 heures | |
| Antibiotique | CMI | Interprétation | Antibiotique | CMI | Interprétation | |
| Ampicilline | >= 32 | R | Amikacine | 8 | *I | |
| Amoxicilline/acide clavulanique | >= 32 | R | Gentamicine | <= 1 | S | |
| Ticarcilline | 64* | R | Nétilmicine | >= 32 | R | |
| Pipéracilline/tazobactam | 32 | I | Tobramycine | 8 | R | |
| Céfalotine | >= 64 | R | Acide nalidixique | >= 32 | R | |
| Céfoxitine | >= 64 | R | Ciprofloxacine | >= 4 | R | |
| Céfotaxime | 2 | I | Norfloxacine | >= 16 | R | |
| Ceftazidime | 4 | I | Ofloxacine | >= 8 | R | |
| Ertapénème | <= 0,5 | S | Nitrofurantoïne | <= 16 | S | |
| Impénème | <= 1 | S | Triméthoprim/sulfaméthoxazole | <= 20 | S | |

+ = Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

| | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|---|--|---|--|
| Résultats AES : | | Dernière modification : 21 janv. 2010 12:56 CST | | Normes/Phénotype : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES | |
| Niveau de fiabilité : | Concordant après correction | | | | |
| Phénotype : | BÉTA-LACTAMINES | <i>BÉTA-LACTAMASE A SPECTRE ETENDU</i> | | | |

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.01
Norme d'interprétation des CMI : CASFM 2009
Nom du jeu de paramètres AES : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES

Politique d'interprétation thérapeutique : Copie de PHENOTYPIC
Dernière modification du paramètre AES : 21 janv. 2010 12:56 CST

Schéma 51 : Interprétation d'antibiogramme d'une souche d'*E. aerogenes* par le VITEK® 2 du laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges

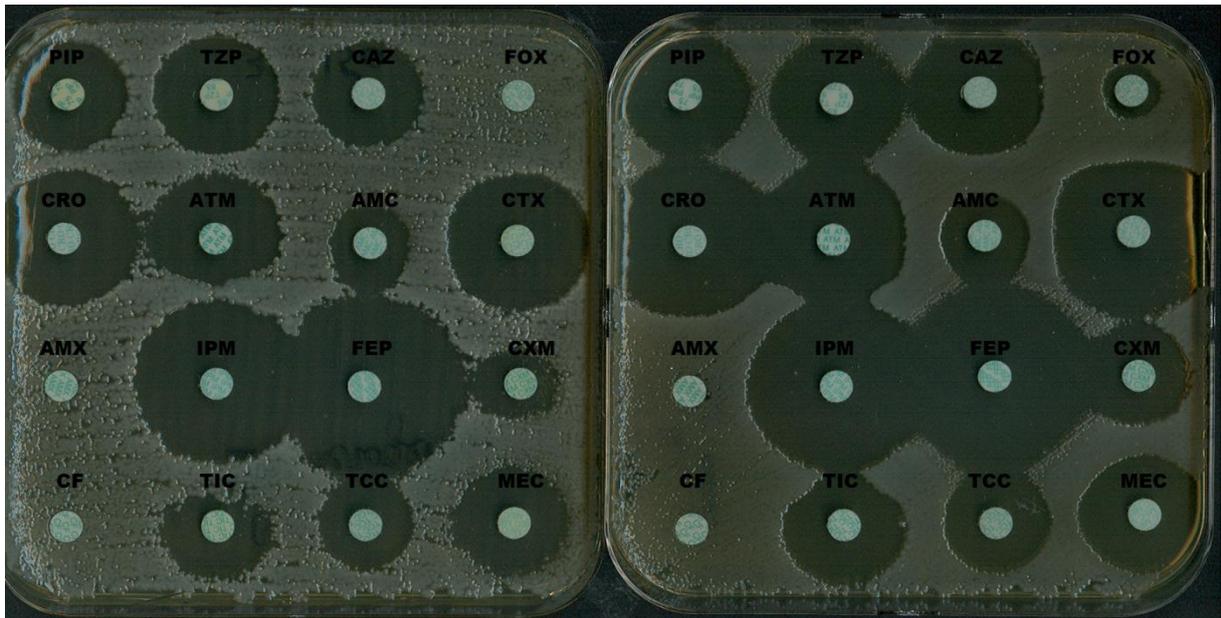


Schéma 52 : Antibiogramme d'une souche d'*E. aerogenes* sur une gélose MH avec et sans cloxacilline

Sur la gélose sans cloxacilline, on ne constate pas la présence de « bouchons de champagne » entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de 3^{ème} génération.

Sur la gélose avec cloxacilline, des images d'antagonisme sont visibles et certains diamètres sont nettement augmentés.

Il s'agit donc d'une souche d'*E. aerogenes* ayant une céphalosporinase dérégulée.

Conclusion

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue ces dernières années un problème sanitaire majeur dans le monde entier. Leurs capacités de diffusion et d'adaptation à l'environnement obligent les cliniciens à une prescription d'antibiotiques raisonnée et argumentée, notamment grâce à un antibiogramme. Ainsi, la détection de ces résistances par le laboratoire doit être rapide et exacte. Cette évolution implique une mise à jour régulière des connaissances des microbiologistes au sujet des mécanismes de résistance mais aussi une amélioration technologique des outils diagnostiques.

Malgré son expertise, le VITEK® rencontre quelques difficultés d'interprétations de phénotypes de résistances. La détermination erronée de la CMI de la piperacilline - tazobactam a engendré des erreurs d'interprétation pour certains groupes bactériens. Cette situation rencontrée au laboratoire du CHU de Limoges est illustrée dans cette thèse.

De nouvelles méthodes de détection ont été mises en place, et notamment les méthodes génétiques d'identification d'ADN, qui permettent de déterminer l'agent infectieux et ses résistances en moins d'une heure.

Toutes ces méthodes, phénotypiques et génétiques, doivent rester complémentaires. Face au pouvoir adaptatif de ces bactéries, les cliniciens et les biologistes se doivent de rester vigilants.

Bibliographie

- [1] BARBIER F, WOLFF M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : Vers l'impasse thérapeutique ?. *Médecine-sciences*, 2010, vol. 26, n° 11, p. 960-968.
- [2] BERCHE P, GAILLART JL, SIMONET M. Structure, mode d'action des antibiotiques et mécanismes de la résistance bactérienne. In *Bactériologie, Bactéries des infections humaines*. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1989, p. 575-592.
- [3] BERTROU A. *BMR : Bactéries multirésistantes* [en ligne]. Carcassonne : SOFOMECC, 2010. Disponible sur <
http://sofomec11.free.fr/Diapos/INFECTIOLOGIE/bmr_dr_bertrou.pdf >. (consulté en juillet 2012)
- [4] BIOMERIEUX. *Diagnostic clinique : Produits* [en ligne]. Disponible sur <
<http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?node=Produits> >. (consulté en juillet 2012)
- [5] BRYSKIER A. Ansamycines. In *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Paris : Ellipses, 1999, p. 947-971.
- [6] BUSH K, JACOBY GA. Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 54, n° 3, p. 969-976.
- [7] CANTON R, COQUE TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, vol. 9, n°5, p. 466-475.
- [8] CATTOIR V, LECLERCQ R. Les entérocoques résistants aux glycopeptides. *Médecine-sciences*, 2010, vol. 26, n° 11, p. 936-942.
- [9] Circulaire DGS/RI/DGOS/PF N° 2010-413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesure de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC).
- [10] DA RE S, PLOY M-C. Antibiotiques et réponse SOS bactérienne : Une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. *Médecine-sciences*, 2012, vol. 28, n° 2, p. 179-184.

- [11] DECOSTER A, LEMAHIEU JC. *Résistance aux antibiotiques* [en ligne]. [s.l.] : [s.n], [s.d]. Disponible sur < <http://anne.decoستر.free.fr/bindex.html> >. (consulté en novembre 2011)
- [12] DENIS F, PLOY M-C, MARTIN C, BINGEN E, QUENTIN R. *Bactériologie médicale : Techniques usuelles*. 2^{ème} édition. Issy-les Moulineaux : Masson, 2011. 631 p.
- [13] DUMITRESCU O, DAUWALDER O, BOISSET S, REVERDY M-E, TRISTAN A, VANDENESCH F. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : Les points-clés en 2010. *Médecine-sciences*, 2010, vol. 26, n° 11, p. 943-949.
- [14] European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010*. 208 p. Rapport annuel de European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Stockholm : ECDC, 2011.
- [15] GUTMANN L, LORTHOLARY O. Coexister avec la résistance aux antibiotiques : Une réalité internationale en 2010. *Médecine-sciences*, vol. 26, n° 11, p. 895-896.
- [16] JEHL F, CHOMARAT M, WEBER M, GERARD A. *De l'antibiogramme à la prescription*. 2^{ème} édition. Marcy L'Etoile : BioMérieux, 2003. 136 p.
- [17] JOLY ML, REGNIER B. *L'infection liée aux soins : Stratégies de maîtrise des infections nosocomiales*. Marcy L'Etoile : BioMérieux, 2005. 104 p.
- [18] LE MINOR L, VERON M. Le monde bactérien. In *Bactériologie médicale*. Paris : Médecine-sciences, 1989, p. 1-140.
- [19] MARTIN X. *Bon usage de la prescription des antibiotiques* [en ligne]. Carcassonne : SOFOMECC, 2010. Disponible sur < http://sofomecc11.free.fr/Diapos/INFECTIOLOGIE/bon_usage_de_la_prescription_des_antibiotiques_dr_x_martin.pdf >. (consulté en juillet 2012)
- [20] NASTALY P, GRINHOLE M, BIELAWSKI P. Molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains for clinical medicine. *Archives of Microbiology*, 2010, vol. 192, n° 8, p.603-617.
- [21] NORDMANN P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif, 2010. *Médecine-sciences*, vol. 26, n° 11, p. 950-959.

[22] PINCUS DH. *Microbial identification using the bioMérieux VITEK®2 system* [en ligne]. Hazelwood : Encyclopedia of rapid microbiological methods, [s.d]. Disponible sur : < https://store.pda.org/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf >. (consulté en septembre 2011)

[23] TREMOLIERES F. Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar, 2010. *Médecine-sciences*, vol. 26, n° 11, p. 925-929.

[24] VITAL DURAND D, LE JEUNNE C. Antibiotiques et antibactériens à action systémique. *In Dorosz*. Paris : Maloine, 2011, p. 72-199.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableau des représentants des pénicillines avec quelques exemples de spécialités commercialisées en France.

| Familles | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|--|--|---|
| Pénicillines G et ses dérivés | Parentérales : BenzylPénicilline (péni G) | Biclinocilline® Extencilline® |
| | Orales : Phénoxy méthyle pénicilline (pénicilline V) | Oracilline® |
| Pénicillines M (antistaphylococciques) | Méthicilline Oxacilline Cloxacilline | Bristopen® Orbénine® |
| Aminopénicillines (pénicillines à large spectre) | Ampicilline -Amoxicilline | Totapen® Proampi® Génériques +++ |
| Carboxy-pénicillines | Ticarcilline | Ticarpén® |
| Acyl-amino-pénicillines (Uréido-pénicillines) | Pipéracilline | Génériques +++ |
| Pénicillines sulfones : inhibiteurs de β -lactamases en association avec une β -lactamine | Sulbactam + Ampicilline | Unacim® |
| | Tazobactam + Pipéracilline | Tazocilline® |

ANNEXE 2 : Liste des céphalosporines avec quelques exemples de spécialités commercialisées en France

| Génération | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|--|---|--|
| Céphalosporines de 1^{ère} génération | Injectables Céfalotine | Kéflin® |
| | Céphalosporines orales: Céfalexine Céfradine, Céfadroxil Céfaclor | Céfacet®, Kéforal® Doncef®, Cefirex® Oracéfal® Alfatil® |
| Céphalosporines de 2^{ème} génération | Injectables Céfoxitine (Céfamycine) Céfuroxime Céfamandole | Méfoxin® Zinnat® Kéfandol® |
| Céphalosporines de 3^{ème} génération | Injectables Céfotaxime Céftriaxone Ceftazidime Cefpirome, Céfépime, | Claforan® Rocéphine® Fortum® Cefrom® Axepim® |
| | Orales Céfixime | Oroken® |

ANNEXE 3 : Liste de quelques représentants du groupe des carbapénèmes, des oxapénèmes et des monobactames avec des exemples de spécialités commercialisées en France

| Groupes | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|---------------------|--|--------------------------------|
| Carbapénèmes | Imipénème Méropénème Ertapénème | Tienam®, Meronem®, Invanz®, |
| Oxapénames | Acide clavulanique (inhibiteur des β -lactamases en association avec une β -lactamine) : associée à l'amoxicilline associée à la ticarcilline | Augmentin® Claventin® |
| Monobactames | Aztréonam | Azactam® |

ANNEXE 4 : Classification de la famille des quinolones avec des exemples de spécialités commercialisées en France

| Familles | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| Quinolones | Acide nalidixique | Négram® |
| Fluoroquinolones | Ofloxacin Norfloxacin Ciprofloxacine | Oflocet® Noroxine® Ciflox® |
| | Lévofloxacine Moxifloxacine | Tavanic® Izilox® |

ANNEXE 5 : Classification de la famille des aminosides avec quelques exemples de spécialités commercialisées en France

| Famille | | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|----------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|
| 2-desoxystreptamine | Groupe de la Kanamycine | Kanamycine Tobramycine Amikacine | Nebcine® Amiklin® |
| | Groupe de la gentamicine | Gentamicine Nétilmicine | Gentalline® Netromicine® |
| Aminocyclitol | Apparentée aux aminosides | Spectinomycine | Trobicine® |

ANNEXE 6 : Classification de la famille des cyclines avec quelques exemples de spécialités commercialisées en France

| Familles | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|-----------------------------------|---|--|
| Cyclines semi-synthétiques | Oxytétracycline Doxycycline Minocycline Lymécycline Métacycline | Terramycine® Doxy® Mynocine® Tetralysal® Physiomycine® |
| Glycyl-cyclines | Tigécycline | Tygacil® |

ANNEXE 7 : Classification de la famille des macrolides avec quelques exemples de spécialités commercialisées en France

| Familles | Antibiotiques (DCI) | Antibiotiques (DCI) |
|-------------------------|--|--|
| Macrolides vrais | 14 atomes Erythromycine Roxithromycine Clarithromycine 15 atomes Azithromycine 16 atomes Josamycine Spiramycine | Erythrocline® Rulid® Naxy® Zeclar® Zithromax® Josacine® Rovamycine® |
| Lincosamides | Lincomycine Clindamycine | Lindocine® Dalacine® |
| Streptogramines | Pristinamycine | Pyostacine® |

ANNEXE 8 : Exemples de familles d'antibiotiques avec leurs représentants et leurs spécialités commercialisées en France

| Familles | Antibiotiques (DCI) | Spécialités |
|-------------------------------|---|--------------------------------|
| Fosfomycine | Fosfomycine | Monuril® Uridoz® Fosfocine® |
| Glycopeptides | Vancomycine Teicoplanine | Vancocine® Targocid® |
| Polymyxines | Polymyxine E | Colistine® |
| Lipopeptides cycliques | Daptomycine | Cubicin® |
| Imidazolés | Métronidazole Ornidazole | Flagyl® Tibéral® |
| Nitrofuranes | Nitrofurantoïne | Furadantine® |
| Ansamycines | Rifampicine | Rifadine® |
| Sulfamides | Sulfadiazine Sulfaméthoxazole + triméthoprime | Adiazine® Bactrim® |
| Oxazolidinones | Linézolide | Zyvoxid® |
| Phénicolés | Thiamphénicol Chloramphénicol | Thiophénicol® Cebenicol® |
| Acide fusidique | Acide fusidique | Fucidine® |

ANNEXE 9 : Mécanismes de résistance du *Pseudomonas aeruginosa*

| Classe d'antibiotiques | Résistances par mutations (chromosomiques) | | | Résistances par acquisition de gènes (quasi exclusivement plasmidiques) | | |
|-------------------------|---|---|-----------------------------------|--|--|--|
| | Mécanisme | Support génétique | Molécules concernées | Mécanisme | Support génétique | Molécules concernées |
| β-lactamines | Hyperproduction de la céphalosporinase ampC | <i>ampC</i> (<i>ampD</i> , <i>ampR</i>) | TIC, TCC, PIP, PTZ, FEP, CAZ, AZT | β-lactamases de classe A¹ | | |
| | | | | Pénicillinases | <i>bla_{PSE}</i> | TIC, PIP |
| | | | | BLSE | <i>bla_{FER}</i> , <i>bla_{GIS}</i> , <i>bla_{VEB}</i> | TIC, TCC, PIP, PTZ, FEP, CAZ, AZT |
| | | | | Carbapénémases | <i>bla_{KPC}</i> | Ensemble des β-lactamines ² (IMI, MER, DOR : I/R) |
| | Efflux actif | <i>MexAB-oprM</i> <i>MexXY-oprM</i> <i>MexCD-oprJ</i> | TIC, TCC, AZT, MER FEP FEP | β-lactamases de classe B¹ (métaallo-carbapénémases) | <i>bla_{SH}</i> , <i>bla_{HP}</i> , <i>bla_{GM}</i> | Ensemble des β-lactamines sauf AZT |
| | Imperméabilité aux carbapénèmes | <i>OprD</i> | IMI (± MER et DOR) | β-lactamases de classe D | <i>bla_{OXA}</i> | Variable (sauf IMI, MER, DOR) |
| Aminosides | Efflux actif | <i>MexXY-oprM</i> | Toutes | Modification des aminosides¹ | <i>AAC(6')-I</i> <i>APH(3')-II</i> | TOB, NET, AMK AMK |
| | | | | Modification de la cible (méthylation de l'ARNr) | <i>rmt</i> | Toutes |
| Fluoroquinolones | Modification de la cible (topo-isomérase II-IV) | <i>gyrA</i> (++) , <i>parC</i> | CIP | Non rapporté (notamment <i>Qnr</i> et <i>AAC[6']-Ib-cr</i>) | | |
| | Efflux actif | <i>MexAB-oprM</i> <i>MexXY-oprM</i> <i>MexCD-oprJ</i> Autres | CIP | | | |
| Colistine | Modifications de la structure de la membrane externe (exceptionnelle) | | | | Non rapporté | |

ANNEXE 10 : Exemple de fiche de liaison inter-établissement pour les patients porteurs de bactéries multirésistantes



**FICHE DE LIAISON INTER ETABLISSEMENT
POUR LES PATIENTS PORTEURS DE BACTERIES
MULTIRESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES**

| | |
|--|---|
| <p align="center">Etablissement :</p> <p>Nom :</p> <p>Tél :</p> <p>Fax :</p> | <p align="center">Identification du patient :</p> <p>Nom :</p> <p>Prénom :</p> <p>Date de naissance :</p> |
|--|---|

1. NATURE DE LA BMR :

S.A.R.M. (*Staphylococcus aureus* Résistant à la Métilcilline)

P.A.R.C. (*Pseudomonas aeruginosa* intermédiaire ou Résistant à la Céfazidime)

E.R.C. (Entérobactérie Résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération)

E.R.V. (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* intermédiaires ou résistants à la Vancomycine)

Autres :

2. SITE DE PRELEVEMENT :

Urines Pulmonaire Cathéters Dépistage systématique de BMR

Selles ORL.Ophthalmo Hémocultures Sphère génitale

Plaies Prélèvement profond Autres

3. PRECAUTIONS COMPLEMENTAIRES D'HYGIENE :

Précautions complémentaires d'hygiène : Oui NON

Si oui, Contact Gouttelettes

Date de levée d'isolement :/...../.....

4. TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE (Pour BMR ou pour autre raison) :

Traitement antibiotique en cours Oui NON

Lequel ? **Date de début du traitement** :/...../.....

Cette fiche doit suivre le patient dans tous ses déplacements et lors de transferts entre les établissements de soins des hauts cantons. Un portage de BMR n'est pas une raison de non admission.

ANNEXE 11 : Composition de certains milieux de culture

| | | |
|---|--|---|
| Columbia au sang de mouton (COS) | Polypeptone Peptone pancréatique de cœur Extrait autolytique de levure Amidon de maïs Chlorure de sodium Colistine Acide nalidixique Agar Sang de mouton | 17 g/l 3 g/l 3 g/l 1 g/l 5 g/l 10 g/l 15 g/l 14 g/l 5 % |
| Gélose Mueller-Hinton (MH) | Infusion de viande de bœuf Hydrolysate de caséine Amidon Agar PH 7,4 ± 0,2 | 300 g/l 17,5 g/l 1,5 g/l 17 g/l |
| Drigalski | Peptone Extrait de viande Extrait de levure Lactose Desoxycholate de sodium Cristal de violet Bleu de bromothymol Thiosulfate de sodium Agar PH 7,4 | 15 g/l 3 g/l 3 g/l 15 g/l 1 g/l 0,005 g/l 0,08 g/l 1 g/l 11 g/l |
| Bouillon cœur-cervele | Infusion de cervelle de veau Infusion de cœur de bœuf Protéose-peptone Glucose chlorure de sodium phosphate disodique PH 7,4 ± 0,2 | 12,5 g/l 5 g/l 10 g/l 2 g/l 5 g/l 2,5 g/l |

ANNEXE 12 : Résultat d'interprétation d'antibiogramme rendu par le VITEK® 2 pour une souche d'*E. cloacae* n°458533 au CHU de Limoges

CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES

Identifiant bioMérieux : 16561
Référence du système : VTK21481

Rapport du laboratoire

Imprimé 23 juil. 2010 11:01 CDT
Imprimé par :

Nom du patient
Groupe d'isolats : 458533-1

ID du patient :
Paillasse : vert

Profil biochimique : 0627631153573010
Germe sélectionné : Enterobacter cloacae

| | |
|-----------------------|--|
| Commentaires : | |
| | |
| | |

| | | | |
|---|--|------------------------------|--|
| Informations sur l'identification | Carte : GN | N° de lot : 241157840 | Péremption : 10 avr. 2011 13:00 CDT |
| | Terminée le : 21 juil. 2010 20:20 CDT | État : Final | Heure de l'analyse : 7,00 heures |
| Germe sélectionné | 92% de probabilité Enterobacter cloacae | | |
| Profil biochimique : | 0627631153573010 | Fiabilité : | Bonne identification |
| Germe SRF | | | |
| Germes identifiés et tests discriminants : | | | |
| Commentaire sur l'ident. : | | | |
| Tests à l'encontre | | | |
| Enterobacter cloacae dSOR(98), PLE(99), | | | |

| | | | | | |
|---------------------------------|---|------------------------------|--|------------|-----------------------|
| Résultats Antibiogramme | Carte : AST-N103 | N° de lot : 413172240 | Péremption : 1 sept. 2011 13:00 CDT | | |
| | Terminé le : 21 juil. 2010 20:41 CDT | État : Final | Heure de l'analyse : 7,25 heures | | |
| Antibiotique | CMI | Interprétation | Antibiotique | CMI | Interprétation |
| Ampicilline | >= 32 | R | Amikacine | <= 2 | S |
| Amoxicilline/acide clavulanique | >= 32 | R | Gentamicine | >= 16 | R |
| Ticarcilline | >= 128 | R | Nétilmicine | <= 1 | S |
| Pipéracilline/tazobactam | >= 128 | R | Tobramycine | 8 | R |
| Céfalotine | >= 64 | R | Acide nalidixique | >= 32 | R |
| Céfoxitine | >= 64 | R | Ciprofloxacine | >= 4 | R |
| Céfotaxime | >= 64 | R | Norfloxacine | >= 16 | R |
| Ceftazidime | >= 64 | R | Ofloxacine | >= 8 | R |
| Ertapénème | 1 | I | Nitrofurantoïne | 64 | S |
| Impénème | <= 1 | S | Triméthoprime/sulfaméthoxazole | >= 320 | R |

+= Antibiotique déduit *= Modification AES **= Modification Utilisateur

| | | |
|------------------------------|---|--|
| Résultats AES : | Dernière modification : 13 juil. 2010 09:42 CDT | Normes/Phénotype : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES |
| Niveau de fiabilité : | Concordant | |
| Phénotype : | BÉTA-LACTAMINES CÉPHALOSPORINASE À HAUT NIVEAU (AmpC) | |

ANNEXE 13 : Antibiogramme de la souche d'*E. cloacae* n°458533 sur gélose MH avec et sans cloxacilline



ANNEXE 14 : Résultat d'interprétation d'antibiogramme rendu par le VITEK® 2 pour une souche d'*E. cloacae* n°341366 au CHU de Limoges

CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES

Client bioMérieux : 16561
Référence du système : VTK21481

Rapport du laboratoire

Imprimé 20 juil. 2010 10:22 CDT
Imprimé par :

Nom du patient
Groupe d'isolats : 341366-1

ID du patient :
Paillasse : rouge

Profil biochimique : 0627631153533010
Germe sélectionné : Enterobacter cloacae

| | |
|----------------|--|
| Commentaires : | |
| | |
| | |

| | | | | | | |
|--|--|-------------------------|-------------|-----------|----------------------|------------------------|
| Informations sur l'identification | Carte : | GN | N° de lot : | 241157840 | Péremption : | 10 avr. 2011 13:00 CDT |
| | Terminée le : | 16 juil. 2010 18:49 CDT | État : | Final | Heure de l'analyse : | 7,00 heures |
| Germe sélectionné | 92% de probabilité Enterobacter cloacae | | | | | |
| Germe SRF | Profil biochimique : 0627631153533010 Fiabilité : Bonne identification | | | | | |
| Germes identifiés et tests discriminants : | | | | | | |
| Commentaire sur l'ident. : | | | | | | |
| Tests à l'encontre | | | | | | |
| Enterobacter cloacae dSOR(98),PLE(99). | | | | | | |

| | | | | | | |
|---------------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| Résultats Antibiogramme | Carte : | AST-N103 | N° de lot : | 413172240 | Péremption : | 1 sept. 2011 13:00 CDT |
| | Terminé le : | 16 juil. 2010 19:26 CDT | État : | Final | Heure de l'analyse : | 7,50 heures |
| Antibiotique | CMI | Interprétation | Antibiotique | CMI | Interprétation | |
| Ampicilline | >= 32 | R | Amikacine | >= 64 | R | |
| Amoxicilline/acide clavulanique | >= 32 | R | Gentamicine | >= 16 | R | |
| Ticarcline | >= 128 | R | Nétilmicine | >= 32 | R | |
| Pipéracilline/tazobactam | >= 128 | R | Tobramycine | >= 16 | R | |
| Céfalotine | >= 64 | R | Acide nalidixique | >= 32 | R | |
| Céfoxitine | >= 64 | R | Ciprofloxacine | >= 4 | R | |
| Céfotaxime | >= 64 | R | Norfloxacine | 8 | R | |
| Ceftazidime | >= 64 | R | Ofloxacine | >= 8 | R | |
| Ertapénème | <= 0,5 | S | Nitrofurantoïne | 64 | S | |
| Imipénème | <= 1 | S | Triméthoprime/sulfaméthoxazole | >= 320 | R | |

+ = Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

| | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Famille d'antibiotiques | Phénotypes détectés |
| BÉTA-LACTAMINES | CÉPHALOSPORINASE À HAUT NIVEAU (AmpC) |
| AMINOSIDES | RÉSISTANT GEN TOB NET AMI (AAC(6)+?) |
| QUINOLONONES | RÉSISTANT |
| FURANES | SAUVAGE, RÉSISTANT |
| TRIMÉTHOPRIME/SULFAMIDES | RÉSISTANT |

ANNEXE 15 : Antibiogramme de la souche d'*E. cloacae* n°341366 sur gélose MH avec et sans cloxacilline



ANNEXE 16 : Résultat d'interprétation d'antibiogramme rendu par le VITEK® 2 pour une souche d'*E. cloacae* n°340086 au CHU de Limoges

Client bioMérieux : 16561
 Référence du système : VTK21481

Rapport du laboratoire

Imprimé 18 juin 2010 10:09 CDT
 Imprimé par

Nom du patient

*** Alerte activée ***

ID du patient

Groupe d'isolats : 340086-1

Paillasse : rouge

Profil biochimique : 0605634653542010
 Germe sélectionné : Enterobacter cloacae

| Résultats Antibiogramme | | | Carte : AST-N103 | N° de lot : 413171210 | Péréemption : 22 août 2011 13:00 CDT |
|---------------------------------|--------|----------------|--|-----------------------|---|
| | | | Terminé le : 17 juin 2010 02:10 CDT | État : Final | Heure de l'analyse : 11,50 heures |
| Antibiotique | CMI | Interprétation | Antibiotique | CMI | Interprétation |
| Ampicilline | >= 32 | R | Amikacine | <= 2 | S |
| Amoxicilline/acide clavulanique | >= 32 | R | Gentamicine | 4 | I |
| Ticarcilline | >= 128 | R | Nétilmicine | <= 1 | S |
| Pipéracilline/tazobactam | >= 128 | R | Tobramycine | 4 | I |
| Céfalotine | >= 64 | R | Acide nalidixique | >= 32 | R |
| Céfoxitine | >= 64 | R | Ciprofloxacine | >= 4 | R |
| Céfotaxime | 32 | R | Norfloxacine | 8 | R |
| Ceftazidime | 4 | I | Ofloxacine | >= 8 | R |
| Ertapénème | 1 | I | Nitrofurantoïne | 128 | R |
| Imipénème | <= 1 | S | Triméthoprim/sulfaméthoxazole | >= 320 | R |

+ = Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur

| | | | | | |
|-----------------------|-----------------|---|--|---|--|
| Résultats AES : | | Dernière modification : 21 janv. 2010 12:56 CST | | Normes/Phénotype : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES | |
| Niveau de fiabilité : | Concordant | | | | |
| Phénotype : | BÉTA-LACTAMINES | CÉPHALOSPORINASE À HAUT NIVEAU (AmpC) | | | |

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.01

Norme d'interprétation des CMI : CASFM 2009

Nom du jeu de paramètres AES : CHU DUPUYTREN 87 LIMOGES

Politique d'interprétation thérapeutique : Copie de PHENOTYPIC

Dernière modification du paramètre AES : 21 janv. 2010

12:56 CST

Page 2 / 2

ANNEXE 17 : Antibiogramme de la souche d'*E. cloacae* n°340086 sur gélose MH avec et sans cloxacilline



ANNEXE 18 : Information reçue par l'équipe bioMérieux concernant les interprétations erronées survenues au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges.

Objet : RE: Vitek

Bonsoir

suite à ton mail voici les réponses que je peux te faire

L'impact d'une TZP augmentée sur l'expertise AES est surtout observé pour les entérobactéries du groupe 3 (avec Case inductible) car le TZP joue un rôle plus important dans la discrimination ESBL/Case haut niveau que pour les entérobactéries des groupes 1 et 2.

Une CMI TZP ≥ 128 écarte la possibilité de BLSE.

Pourquoi plus les enterobacter ? Le problème ne se limite pas aux Enterobacter. La même chose peut se produire avec *C. freundii*, par exemple, mais sans doute moins fréquemment car la prévalence des BLSE est plus importante chez les Enterobacter que chez les autres espèces du groupe 3: il y a donc une probabilité plus grande qu'une BLSE soit manquée chez les Enterobacter que chez les autres espèces du groupe 3.

Pour pallier ce problème, ce que je peux te proposer est de supprimer le rendu de la TZP de l'analyse pour enterobacter (création d'une règle bioart spécifique), non seulement la TZP n'apparaîtra pas mais elle ne sera pas prise en compte par AES pour déterminer le phénotype de résistance. A savoir, que te sera proposée alors la BLSE peut être pas en revanche en un choix.

Cela suppose donc que vous soyez obligé de tester la TZP si besoin, en parallèle en diffusion.

Voilà pour l'instant ce que je peux te proposer comme solution alternative, si vous tu es d'accord avec cette approche, oui il faudra passer par la hot line, afin que nous déclenchions une action terrain pour installer la règle.

je te souhaite une belle soirée

Dictionnaire des abréviations

BMR : Bactéries multirésistantes

SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline

GISA : *Staphylococcus aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides

ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine

EBLSE : Entérobactéries sécrétrices de β - lactamase à spectre étendu

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénémases

PAR : *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant

EBCASE : Entérobactéries résistantes aux β - lactamines par hyperproduction de céphalosporinases

ABR : *Acinetobacter baumannii* multirésistant

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CF : Céfalotine

AMX : Amoxicilline

CRO : Ceftriaxone

PIP : Pipéracilline

TIC : Ticarcilline

IMP : Imipénème

ATM : Aztreonam

TZP : Pipéracilline + tazobactam

TCC : Ticarcilline + acide clavulanique

FEP : Céfépime

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique

CAZ : Ceftazidime

ETP : Ertapénem

CXM : Céfuroxime

CTX : Céfotaxime

FOX : Céfoxitine

TABLE DES MATIERES

Introduction

1^{ère} partie : Rappels sur l'anatomie bactérienne, les mécanismes d'action des antibiotiques et les principes des mécanismes de résistance des bactéries

| | |
|--|-----------|
| I. Structure bactérienne | 13 |
| A. La paroi cellulaire..... | 14 |
| 1. Rôle de la paroi..... | 14 |
| 2. Structure du peptidoglycane | 15 |
| 3. Biosynthèse du peptidoglycane | 16 |
| B. Ribosomes..... | 18 |
| II. Sites et mode d'action des antibiotiques | 18 |
| A. Antibiotiques actifs sur la biosynthèse du peptidoglycane | 19 |
| 1. La bacitracine..... | 21 |
| 2. La fosfomycine | 21 |
| 3. Les β -lactamines..... | 21 |
| a) Pénames..... | 23 |
| b) Céphèmes | 23 |
| c) Carbapénèmes, oxapénames et monobactames..... | 24 |
| 4. Les glycopeptides..... | 24 |
| B. Antibiotiques actifs sur les membranes | 25 |
| 1. Les polymyxines | 26 |
| 2. Les lipopeptides cycliques..... | 27 |
| C. Antibiotiques actifs sur la synthèse des acides nucléiques..... | 29 |
| 1. Inhibition de la réplication de l'ADN | 29 |
| a) Les quinolones | 29 |
| b) Imidazolés..... | 30 |
| c) Nitrofuranes..... | 30 |
| 2. Inhibition de la transcription | 31 |
| 3. Autres mécanismes | 32 |
| a) Sulfamides..... | 33 |
| b) Les 2-4-diaminopyrimidines | 34 |

| | |
|---|-----------|
| c) Acide para-aminosalicylique..... | 34 |
| D. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines | 34 |
| 1. Aminosides | 34 |
| 2. Tétracyclines | 35 |
| 3. Macrolides et apparentés..... | 37 |
| 4. Linézolide..... | 39 |
| 5. Phénicolés..... | 39 |
| 6. Acide fusidique..... | 39 |
| III. La résistance des bactéries aux antibiotiques | 40 |
| A. La résistance naturelle..... | 40 |
| B. La résistance acquise | 40 |

2^{ème} partie : Les bactéries multirésistantes

| | |
|---|-----------|
| I. Définition des bactéries multirésistantes (B.M.R)..... | 43 |
| II. Les différentes BMR | 43 |
| III. Evolution et origine de la résistance bactérienne | 44 |
| IV. Mécanismes de résistances des BMR | 45 |
| A. <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline (SARM) | 46 |
| B. <i>Staphylococcus aureus</i> de sensibilité diminuée aux Glycopeptides..... | 47 |
| C. Entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) | 50 |
| D. Les Entérobactéries : | 53 |
| 1. Les entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE)..... | 57 |
| 2. Entérobactéries résistantes aux β - lactamines par hyperproduction de céphalosporinases (EBCASE) | 59 |
| 3. Entérobactéries sécrétrices de carbapénémases | 60 |
| E. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistants : PAR | 61 |
| F. <i>Acinetobacter baumannii</i> multirésistant : ABR | 62 |

3^{ème} partie : Dépistage et détection des BMR au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges

| | |
|----------------------------------|-----------|
| I. Dépistage des BMR..... | 64 |
| A. Intérêt du dépistage | 64 |

| | |
|---|---------------|
| B. Politique de dépistage des BMR | 65 |
| C. Recommandations pour la maîtrise de la diffusion des BMR | 66 |
| D. Au CHU de Limoges | 67 |
| II. Détection des BMR | 68 |
| A. Les sites de prélèvement..... | 68 |
| B. Milieux sélectifs des BMR | 69 |
| C. Détection des BMR au laboratoire du CHU de Limoges | 70 |
| 1. Méthodes de détection manuelles | 70 |
| 2. Méthodes de détection automatisées..... | 78 |
| 4^{ème} partie : Problématique rencontrée au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges..... | 82 |
| Conclusion..... | 90 |
| Bibliographie | 92 |
| Annexes..... | 96 |
| Dictionnaire des abréviations..... | 112 |

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

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

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

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE : DETECTION DES BACTERIES MULTIRESISTANTES AU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DU CHU DE LIMOGES

Resumé :

La résistance des bactéries pose, depuis quelques années, un réel problème sanitaire. L'émergence de nouveaux mécanismes de résistances a permis l'apparition de nouvelles souches bactériennes, dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR). L'utilisation intensive d'antibiotiques a favorisé l'émergence de ces souches, obligeant les cliniciens à prescrire des antibiotiques au spectre de plus en plus large.

La diffusion des BMR est mondiale et devient alarmante. Chaque établissement de santé doit mettre en place un programme de lutte contre ces BMR. Ce programme associe des procédures d'hygiène, afin de lutter contre la diffusion de ces BMR, via notamment les transmissions croisées, et une politique de bon usage des antibiotiques, visant à minimiser le phénomène de pression de sélection.

Le dépistage des BMR au laboratoire est important dans le cadre de ce programme. Les résultats d'identifications bactériennes et d'antibiogramme avec les phénotypes de résistances doivent être rendus le plus rapidement possible. Il existe, aujourd'hui, encore des méthodes conventionnelles, à côté de méthodes automatisées, les méthodes génétiques étant réservées à des laboratoires experts.

Le monde bactérien, devenant plus complexe, remet en cause, quelquefois, la fiabilité des méthodes automatisées. Au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges, la détermination erronée de la CMI de la pipéracilline-tazobactam par le VITEK® a entraîné des erreurs dans l'interprétation de phénotypes de résistances chez certaines souches du genre *Enterobacter* spp.

L'expertise des microbiologistes est toujours la seule garantie pour minimiser les risques d'erreurs.

MOTS CLES :

- BMR
- Dépistage
- Antibiotiques
- Antibiogramme
- Résistance