

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 2. Epidémiologie | 6 |
| 2.1. Réservoirs et vecteurs | 6 |
| 2.2. Épidémiologie des infections | 7 |
| 2.3. Epidémiologie de la résistance de <i>P.aeruginosa</i> | 8 |
| 3. Mécanismes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques | 10 |
| 3.1. Résistance aux β-lactamines | 10 |
| 3.1.1. Résistance naturelle | 11 |
| 3.1.2 Résistance acquise | 14 |
| 3.2. Résistance aux aminosides | 25 |
| 3.2.1. Mécanismes de nature enzymatique | 26 |
| 3.2.2. Mécanismes de nature non enzymatique | 26 |
| 3.3. Résistance aux fluoroquinolones | 28 |
| 3.3.1. Modification d'affinité de la cible | 28 |
| 3.3.2. Diminution de la pénétration de l'antibiotique | 28 |
| 3.4. Résistance à la Colistine | 28 |
| 4. Facteurs de pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 |
| 4.1 Facteurs de virulence cellulaire | 30 |
| 4.2. Facteurs de virulence sécrétée | 32 |
| 4.3. Régulation de l'expression des facteurs de virulence | 36 |
| 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et Biofilm | 36 |
| 5.1. Les étapes de la formation du biofilm de <i>P.aeruginosa</i> | 37 |
| 5.2. La résistance de <i>P.aeruginosa</i> au sein de Biofilm | 41 |

Matériel et Méthodes

| | |
|--|-----------|
| 1. Lieu d'étude | 44 |
| 2. Souches bactériennes étudiées | 44 |
| 3. Isolement et identification | 45 |
| 4. Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques | 45 |
| 5-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test | 46 |
| 6. Détection phénotypique des β-lactamases | 46 |
| 6.1. Recherche de la production de BLSE | 46 |
| 6.2. Recherche phénotypique de la production des carbapénèmases | 47 |
| 6.2.1. Détection des carbapénèmases par le Carba NP test modifié | 47 |
| 6.2.2. Test de Hodge | 48 |
| 6.2.3. Détection de MBL par bandelette E-test | 48 |
| 6.2.4. Détection des metallo-β-lactamases (MβL) : Test à l'EDTA | 48 |
| 7. Recherche moléculaire des gènes de résistance | 49 |
| 7.1. Résistance aux β-lactamines | 49 |
| 7.1.1. Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition | 49 |
| 7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) standard | 49 |
| 7.2.1. Gènes de résistance aux β-lactamines | 49 |
| 7.2.2. Typage des carbapénèmases co-produites | 51 |
| 7.2. Résistance aux aminoglycosides | 52 |
| 7.3. Recherche de la coexistence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones | 53 |
| 7.4. Recherche des Intégrons de classe 1 | 55 |
| 8. Analyse des produits de l'amplification | 56 |
| 8.1. Électrophorèse sur gel d'agarose | 56 |
| 9. Séquençage par la méthode de Sanger | 58 |
| 9.3. Purification des produits de séquençage | 59 |
| 10. Détermination phénotypique des facteurs de virulence | 60 |
| 10.1. Détermination de la cinétique de formation de biofilm | 60 |
| 10.2. Détermination de l'effet des antibiotiques sur la cinétique de formation de biofilm | 62 |
| 10.3. Recherche de l'activité protéolytique | 62 |
| 10.4. Recherche de l'activité hémolytique | 63 |
| 10.5. Recherche de la DNase | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 10.6. Mise en évidence de la motilité | 63 |
| 11. Etude de la relation épidémiologique entre les souches étudiées : électrophorèse en champ pulsé | 64 |
| 11.1. Principe | 64 |
| 11.2. Mode opératoire | 65 |
| 12. Les tests statistiques | 69 |
| Résultats et Discussion | |
| Résultats | 70 |
| 1. Isolement et identification des souches bactériennes | 70 |
| 1.1. Répartition des souches par service | 70 |
| 1.2. Répartition des souches par type de prélèvements | 71 |
| 1.3. Caractéristiques de la population | 71 |
| 2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques | 78 |
| 2.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion sur gélose | 78 |
| 2.2. Détermination des phénotypes de résistance aux bêtalactamines | 79 |
| 2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test | 81 |
| 2.4. Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMI) des souches PA-MBL | 82 |
| 3. Recherche phénotypique des carbapénèmases | 83 |
| 4. Détermination des supports génétiques de la résistance | 85 |
| 4.1. Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases | 85 |
| 4.2. Recherche moléculaire des β-lactamases à spectre étendu | 86 |
| 5. Recherche moléculaire de la résistance associée | 87 |
| 5.1. Résistance aux aminosides | 87 |
| 5.2. Résistance aux quinolones | 88 |
| 6. Résistance non enzymatique | 89 |
| 7. Recherche des intégrons de classe 1 | 91 |
| 8. Détermination phénotypique des facteurs de virulence | 92 |
| 8.1. Détermination des facteurs de virulence sécrétés | 92 |
| 8.2. Formation de Biofilm | 94 |
| 8.3. Corrélations entre la multirésistance aux antibiotiques et la virulence phénotypique | 96 |
| 8.4. L'étude de l'impact des concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques sur la formation des biofilms | 99 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| Discussion | 107 |
| Conclusion et perspectives | 129 |
| Références bibliographiques | 133 |
| Résumés | |
| Productions scientifiques | |
| Annexes | |

Liste des abréviations

16S: Svedberg (vitesse de sédimentation)

30S: Ribosome bactérien

A: Adénine (base azotée)

AAC: Aminoglycoside acetyltransferases

AAD: Aminoglycoside adenytransferase

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AHL: Acyl homosérine lactone

AIM: Australia IMipenemase

AME: Aminoglycosides modifying enzymes

AmpC: Bêta-lactamase chromosomique

ANT: Nuclétydyltransférase

APH: Phosphotransférase

API 20NE: Analytical profile index 20NE (N= Non, E= Entérobactéries)

ArmA: Aminoglycoside resistance methylase

ARN: Acide ribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATB: Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine Triphosphate

BEL: Belgium

BET: Bromure d'éthidium

BLAST: Basic Local Alignment tool

BLSE: β -lactamase à spectre étendu

BMR: Bactérie multi-résistante

C: Cytosine (base azotée)

C3G: Céphalosporine de troisième génération

CAZ : Céftazidime

CG%: Pourcentage en guanine et cytosine du génome (coefficient de Chagraff)

CHU: Centre hospitalier universitaire

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CTX-M: Céfotaxime Munich

Cup: Chaperone usher pathway

DHA: Gène codant pour une céphalosporinase

DL50: Dose létale 50

Dnase: Désoxyribonucléase

EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network.

ECP: L'électrophorèse en champ pulsé

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

ESBL: Extended spectrum beta-lactamase

ETA: Exotoxine A

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

<http://www.eucast.org/>

F: Forward

FK: Fibrose kystique

FQ: Fluoroquinolones

G: Guanine (base azotée)

GES: Guiana Extended Spectrum

GES: Guyana extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)

GIM: German IMipenemase

gyrA: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

gyrB : Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H: Heures

H2O UP: Eau Ultra-Pure

IMP : Imipéménase (carbapénémase)

INs : Infection nosocomiales

Int : Intégrons

Kb: Kilobases

kDA : Kilodalton

KPC : Klebsiella pneumoniae Carbapenemase

Las: Élastases

LB : Lauria Bertani

LDC: Lysine décarboxylase

LPS: Lipopolysaccharide

LRP: LDL related protein

M: Marqueur

MBL: Métallo- β -lactamase

MH: Mueller Hinton

NCBI: Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

NDM: New Delhi Metallo- β -lactamase

O: Antigène somatique

OMP : Outer membrane protein

Opr : Outer membrane protein

OXA : oxacillinases à spectre étendu

OXA: Oxacillinase (carbapénémase)

p.a : Pseudomonas aeruginosa

PASM: Pseudomonas aeruginosa Small Protein

Pb : Paires de bases

PCR: Polymerase chain reaction

PER: Pseudomonas Extended Resistance

PFGE: Pulsed Field Electrophoresis Gel

pH: Potentiel hydrogène

PLP: Protéines liant les pénicillines

PMQR : Plasmid mediated quinolone resistance

Qnr: Quinolone resistance gene

QS: Quorum sensing

R: Reverse (inverse)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Rmt: ARNr 16S méthyltransférase

RPM: Rotation par minute

SHV: Sulfhydryl variable

SPM: Sao-Paulo Metallo- β -lactamase

spp : Species (espèces)

TBE: Tris-Broat-EDTA

TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TSB : Trypto-caséine soja

UFC: Unité Formant Colonie

UV: Ultra-violet

V: Volt

VEB: Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase

VIM: Verona Imipéménase (carbapénémase)

Liste des Tableaux

| Numéro | Titre | Page |
|---------------|--|-------------|
| 1 | Interprétation des résultats du Carba NP test modifié | 47 |
| 2 | Les conditions d'amplification utilisées pour la PCR des gènes BLSE recherchées | 50 |
| 3 | Les amorces utilisées pour typer les BLSE produites | 50 |
| 4 | les amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour des carbapénèmases plasmidiques. | 51 |
| 5 | Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux aminoglycosides | 52 |
| 6 | les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de résistance plasmidiques aux quinolones | 53 |
| 7 | Composition du mélange réactionnel pour les PCR multiplexe | 54 |
| 8 | Composition du mélange réactionnel pour les PCR RFLP | 55 |
| 9 | les souches de références utilisées pour le contrôle des PCRs | 57 |
| 10 | Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye | 59 |
| 11 | Programme de l'amplification de la PCR BigDye | 59 |
| 12 | Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générée par PFGE | 68 |
| 13 | Répartition des taux de résistance des souches par service | 72 |
| 14 | Répartition des taux de résistance des souches par type de prélèvements | 73 |
| 15 | Les facteurs de risque associés à la multirésistance durant la première étude | 73 |
| 16 | Les antibiotiques administrés aux patients hospitalisés avant l'isolement de <i>P.aeruginosa</i> | 75 |
| 17 | Les facteurs de risque associés à la multirésistance de <i>P.aeruginosa</i> dans le service des brûlés | 76 |
| 18 | Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les services | 80 |
| 19 | Les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour la souche 04 | 81 |
| 20 | Résultats de formation de biofilm par les isolats de <i>P.aeruginosa</i> | 89 |
| 21 | Résultats de formation de biofilm par les isolats de <i>P.aeruginosa</i> | 95 |

Liste des Figures

| Numéro | Titre | Page |
|---------------|---|-------------|
| 1 | β -lactamases de Classe A et D rapportées chez <i>P. aeruginosa</i> dans les pays méditerranéens | 22 |
| 2 | MBLs de type VIM rapportées chez <i>P. aeruginosa</i> dans les pays méditerranéens | 25 |
| 3 | La séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction <i>FokI</i> | 55 |
| 4 | La technique de Formation de biofilm en microplaque PVC | 61 |
| 5 | Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé | 65 |
| 6 | l'électrophorèse en champ pulsé, mode opératoire, et photo d'un gel. | 65 |
| 7 | Répartition des souches par service | 70 |
| 8 | Répartition des souches selon le type de prélèvement | 71 |
| 9 | Répartition des souches selon le sexe des patients | 72 |
| 10 | Sensibilité aux antibiotiques des 110 souches de <i>P.aeruginosa</i> | 77 |
| 11 | Capacité des souches de <i>P.aeruginosa</i> à former un biofilm | 95 |
| 12 | formation de biofilm selon les phénotypes de résistance | 96 |
| 13 | Comparaison entre la capacité de formation de biofilm entre les isolats de <i>P.aeruginosa</i> résistants aux carbapénème (CRPA) et ceux qui sont sensibles aux carbapénèmes (CSPA) | 97 |
| 14 | caractérisation des phénotypes de virulence accordée à la formation de biofilm | 97 |
| 15 | Quantification de la biomasse par coloration au cristal violet en présence de concentrations accrues d'imipénème et de ciprofloxacine dans des microplaques de microtitrage | 99 |
| 16 | la cinétique d'adhésion des souches de <i>P. aeruginosa</i> cultivées en présence et en l'absence de différentes concentrations de ciprofloxacine | 101 |
| 17 | la cinétique d'adhésion des souches de <i>P. aeruginosa</i> cultivées en présence et en l'absence de différentes concentrations de l'imipénème | 102 |
| 18 | Dendrogramme établi par le logiciel Dendro UPGMA, à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 15 souches de <i>P.aeruginosa</i> | 103 |
| 19 | Dendrogramme établi par le logiciel Dendro UPGMA, à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 15 souches de <i>P.aeruginosa</i> | 104 |

Liste des Photos

| Numéro | Titre | Page |
|---------------|--|-------------|
| 1 | Antibiogramme d'une souche de <i>P.aeruginosa</i> multirésistante | 78 |
| 2 | Teste de Cloxacilline d'une souche de <i>P.aeruginosa</i> sans et en présence de la cloxacilline | 79 |
| 3 | Le caractère inductible de la céphalosporinase partiellement déréprimée | 79 |
| 4 | Concentrations minimales inhibitrices par E-test d'une souche de <i>P.aeruginosa</i> résistante à l'imipénème. Détection des MBL par bandelette E-test. | 81 |
| 5 | Test de synergie EDTA-IMP chez des souches <i>P. aeruginosa</i> productrice d'une carbapénèmase. Test de synergie EDTA-IMP chez une souche de <i>P. aeruginosa</i> qui n'est pas productrice d'une carbapénèmase. | 83 |
| 6 | Résultats de test Carba NP modifié | 84 |
| 7 | Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>blaVim</i> | 85 |
| 8 | Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>blaPSE-1</i> | 85 |
| 9 | Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>aac(3')-II</i> | 86 |
| 10 | Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène <i>rmtB</i> | 87 |
| 11 | Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène <i>qnrB</i> | 88 |
| 12 | Résultats de la PCR <i>oprD</i> | 89 |
| 13 | Résultats de la PCR des integrons de classe I | 90 |
| 14 | Le caractère hémolytique des souches testées | 92 |
| 15 | Le caractère protéolytique des souches et le caractère ADNase | 92 |
| 16 | Mobilité de type Swimming, Mobilité de type Swarming | 93 |
| 17 | Evaluation de la production de biofilm par la méthode de CV | 94 |

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre ».

Marie Curie



INTRODUCTION

Introduction

Depuis l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante du siècle passé, un grand nombre d'agents antibactériens ont été développés et commercialisés à des fins thérapeutiques, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité humaine importantes associées aux infections bactériennes observées avant « l'ère des antibiotiques ».

Pourtant, l'optimisme initial, fondé sur l'intime conviction que toute infection bactérienne pouvait être traitée avec ces composés, fut rapidement renversé quand les premiers rapports d'émergence de résistances aux antibiotiques virent le jour peu après leur introduction en clinique pour le traitement des maladies infectieuses, le rendant ainsi difficile et parfois impossible (Harbottle, Thakur et al. 2006).

Ainsi, les défis majeurs de la résistance sont principalement rencontrés chez les espèces d'entérobactéries, de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* qui sont parmi les plus importants agents d'infections nosocomiales (Rossolini and Mantengoli 2005).

Les infections nosocomiales causées par ces bactéries à Gram négatif multirésistantes aux antibiotiques (BGN-MR) sont devenues une menace à l'échelle planétaire, prise très au sérieux par les autorités sanitaires qui, comme l'OMS (organisation mondiale de la santé), commencent à multiplier les mises en garde et les plans d'action (Harbottle, Thakur et al. 2006).

Les deux facteurs essentiels au développement des résistances bactériennes sont, d'une part, l'usage abusif des antibiotiques, favorisant la sélection des bactéries les plus résistantes, et d'autre part, une insuffisance des pratiques d'hygiène en particulier le lavage des mains.

Récemment, plusieurs études ont démontré également que la résistance pouvait émerger de souches anciennes mais aussi de sources environnementales (Rolain, Canton et al. 2012).

Au cours de la dernière décennie, les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* ont été rapportées partout dans le monde, avec une émergence rapide et croissante de souches multirésistantes, la plupart du temps dans des unités de soins intensifs (Gaynes and Edwards 2005).

P. aeruginosa présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre restreint. Les résistances acquises pour ces antibiotiques sont cependant très fréquentes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance liés à des mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes exogènes aboutissant rapidement à une impasse thérapeutique, expliquant ainsi les taux de résistance constatés dans de nombreux pays du bassin méditerranéen, notamment dans les pays de l'Afrique du nord (Jeannot and Plésiat).

Introduction

La surveillance épidémiologique des résistances aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif, dont les souches de *P. aeruginosa*, montre ces dix dernières années en Algérie l'émergence de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (Bakour, Kempf et al. ; Drissi, Ahmed et al. 2008; Aggoune-Khinache, Bensorsa et al. 2009; Baba Ahmed-Kazi Tani, Decre et al. 2013; Bakour, Touati et al. 2013; Mesli, Berrazeg et al. 2013). Ceci reflète la problématique des souches multirésistantes, présentant des résistances associées à au moins 3 classes d'antibiotiques, pour lesquelles la colistine reste souvent la seule molécule active, compliquant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients. Ainsi, l'émergence progressive de souches multirésistantes produisant des β -lactamases à spectre étendu (BLSEs), des oxacillinases à large spectre (ES-OXA) ou des métallo-carbapénèmases (MBLs) à l'origine de petits foyers épidémiques, doit entraîner une vigilance extrême de la part des cliniciens afin de pouvoir stopper la dissémination de ces souches. De même, l'acquisition des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique des infections et pour élaborer une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne (De Bentzmann et Plésiant 2011).

P.aeruginosa est non seulement l'un des agents pathogènes nosocomiaux les plus fréquents présentant une résistance acquise importante, mais il est aussi un modèle de bactéries pathogènes avec une grande adaptabilité due à plusieurs facteurs incluant un métabolisme extrêmement versatile lui permettant de dégrader plusieurs composées, de coloniser plusieurs niches écologiques (Bagge, Schuster et al. 2004; Berthelot, Grattard et al. 2005).

Sa pathogénicité repose sur un arsenal complexe constitué de facteurs solubles (toxines, enzymes, exopolysaccharides...) et d'attributs cellulaires (pili, systèmes de sécrétion...) dont les rôles sont complémentaires, et dont la production dépend de multiples circuits de régulation (de Bentzmann and Plésiat 2011; Cho, Kwon et al. 2014). Parmi les nombreux déterminants de la virulence de *P. aeruginosa*, la formation de biofilm est le plus important, car il est fortement corrélée avec la résistance aux antibiotiques (Jung, Nam et al. 2014).

La résistance ou la tolérance des biofilms bactériens qui peut être 1000 fois plus importante que celle des mêmes cellules à l'état planctonique à pratiquement tous les antibiotiques est liée à plusieurs facteurs. Les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas pleinement élucidés; interviendraient une diminution des processus de diffusion des molécules au sein des agrégats impliquant entre autres un ralentissement de métabolisme des cellules bactériennes et une plus grande capacité à transférer des gènes de résistance (Jung, Nam et al. 2014).

Introduction

La présence des biofilms lors d'une infection n'est pas diagnostiquée par les méthodes usuelles de Microbiologie et de ce fait toutes les infections sont traitées de la même manière. Cependant toutes les études et les preuves s'accumulent pour reconnaître que le biofilm est un véritable bouclier à l'action des antimicrobiens.

La médecine actuelle doit faire face à la prise en compte des infections impliquant des biofilms qui se forment sur des dispositifs médicaux tel que les sondes urinaires, les cathéters et les implants, puisqu'on estime que 60 % des infections associées aux soins auraient pour origine un dispositif invasif (Balaban, Giacometti et al. 2003).

Egalement, la présence d'antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices pourrait modifier la capacité des bactéries à former des biofilms. Cette problématique est particulièrement importante dans le cas des formes infectieuses chroniques où les biofilms jouent un rôle essentiel en hébergeant des formes bactériennes à l'origine de la chronicité.

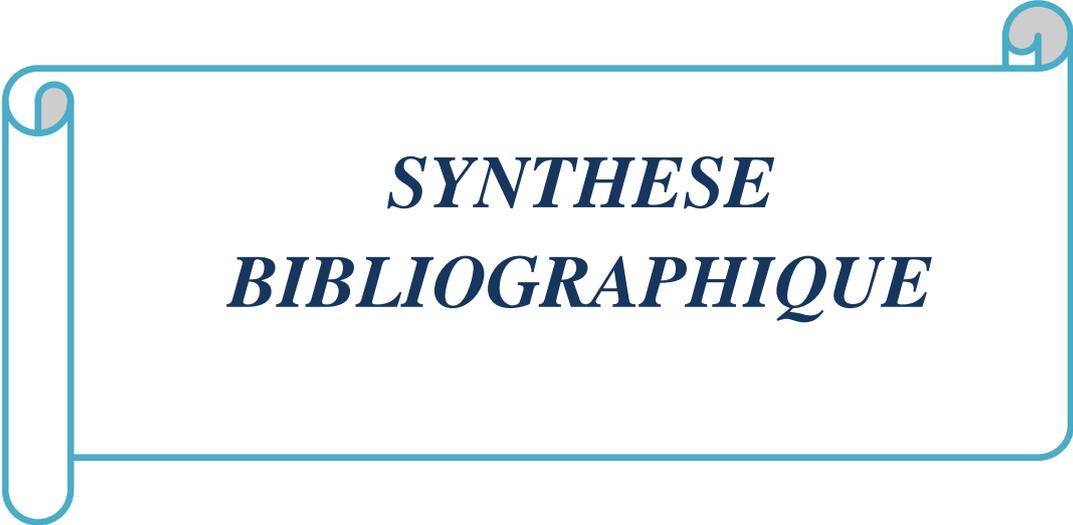
Considérant que le biofilm est un facteur critique pour l'efficacité des antimicrobiens et la propagation de la résistance aux antibiotiques, C'est dans ce cadre d'idées que ce projet de thèse s'inscrit avec comme principaux objectifs :

- Evaluation de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'épidémiologie moléculaire des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir de trois centres hospitalo-universitaires (CHU) du nord-est algérien, incluant le CHU Ibn Sina, le CHU Ibn Rochd ainsi que le CHU Dorban, ce dernier (CHU Dorban) faisant partie du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques (Belbel, Chettibi et al. 2014).
- Détermination des facteurs de risque liés à la résistance à l'imipénème et les différents phenotypes de virulence.
- Evaluation de l'effet de l'imipénème et la ciprofloxacine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

Le premier chapitre présente l'agent pathogène *Pseudomonas aeruginosa* en élucidant ses mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement des infections causées par cette bactérie, incluant, les β -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones ainsi que la colistine. Aussi, une mise au point est faite sur l'épidémiologie des gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés dans les pays méditerranéens, notamment ceux retrouvés dans les pays de l'Afrique du nord. En suite une revue bibliographique est faite sur les différents facteurs de virulence ainsi que les propriétés du biofilm associés à cette

Introduction

bactérie. Le deuxième chapitre présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.



***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

Synthèse bibliographique

1. *Pseudomonas aeruginosa*

C'est une bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* a reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat). Le chirurgien *Charles-Emmanuel Sedillot* en 1850 fut le premier à observer que la coloration de pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible (Lister, Wolter et al. 2009). C'est en 1869 que *Fordos* a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (Williams and Cameron 1894). *P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois treize ans plus tard en 1882 par *Gessard* qui a démontré que ce pigment a été le produit d'un organisme, *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) (Gessard,1984).

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif ubiquitaire, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques, non sporulant, non capsulé, de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large.

Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, non fermentaire, aérobie stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobie.

P.aeruginosa est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive.

Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone, mais également en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Van Alst, Wellington et al. 2009).

Le génome de *P. aeruginosa* a été séquencé en 2000 chez la souche de référence PAO1 (Stover, Pham et al. 2000). C'est l'un des plus grands génomes bactériens séquencés, ce qui donne un aperçu sur sa grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique ainsi que la résistance intrinsèque aux antibiotiques (Stover, Pham et al. 2000). Ce chromosome bactérien comprend 6,3 millions de paires de bases, codant pour 5570 gènes, dont 70% à 90% des gènes sont spécifiques de l'espèce, et 10% à 30% sont spécifiques du clone bactérien. Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité de *P.aeruginosa*, et pour les multiples protéines conférant la résistance aux différentes classes d'antibiotiques (Stover, Pham et al. 2000).

Outre le chromosome bactérien, *P.aeruginosa* possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction et la plupart des souches (probablement 100% des

souches) sont lysogènes et souvent polylysogènes (une même souche peut héberger 8 à 10 phages tempérés sur son chromosome ou sur un plasmide). Cette haute fréquence de lysogénie n'est pas retrouvée pour les autres espèces du genre *Pseudomonas*.

La présence de plasmides et de phages tempérés explique les nombreuses variations génétiques observées dans cette espèce. Elle explique, au moins partiellement, la fréquence des souches polyrésistantes aux antibiotiques (Stover, Pham et al. 2000).

P.aeruginosa présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre limité.(Mesaros, Nordmann et al. 2007). Malheureusement, la perspective d'avoir de nouveaux agents anti-pseudomonal à l'utilisation clinique dans un avenir proche n'est pas prometteur (Lister, Wolter et al. 2009).

2. Epidémiologie

2.1. Réservoirs et vecteurs

P. aeruginosa est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiales. Cette bactérie opportuniste est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques. Pour les sujets en bonne santé, *P.aeruginosa* est peu présent, avec seulement 2 à 10 % de porteurs tandis que chez les sujets hospitalisés ce taux peut atteindre 50 %, voire 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres. Le milieu hospitalier peut être un habitat idéal pour ce micro-organisme. En effet, de nombreuses niches écologiques existent dans les hôpitaux, en particulier au niveau des points d'eau et des milieux humides, notamment au niveau des robinets et des siphons (Bertrand, Thouverez et al. 2001; Trautmann, Michalsky et al. 2001; Minchella, Molinari et al. 2010). *P. aeruginosa* peut aussi contaminer le matériel hospitalier, tel que les endoscopes, les nébulisateurs, les équipements de dialyse, les analyseurs de gaz du sang ou encore les bains maries, les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux ou cosmétiques (Lister, Wolter et al. 2009). Ainsi de nombreuses épidémies hospitalières ont été imputées à la contamination de divers équipements et/ou matériels humides (Bertrand, Slekovec et al. 2011).

Cette bactérie peut se trouver également à l'état sessile dans un biofilm (Costerton, Lewandowski et al. 1995).

Le rôle de l'environnement hospitalier dans la colonisation des patients par *P. aeruginosa* est une question clé en matière de prévention des infections nosocomiales puisque la présence d'une souche dans l'environnement peut être tout autant la conséquence de la colonisation du patient qu'une source d'acquisition. De nombreuses études visant à évaluer la part des points d'eau dans la colonisation/infection des patients ont été menées. Certaines attribuent un rôle majeur aux points d'eau sur l'incidence de la colonisation des patients, d'autres, en revanche, ne rapportent qu'un faible lien épidémiologique entre la présence de *P. aeruginosa* dans l'environnement hospitalier et la survenue d'infections chez les patients (Bertrand, Slekovec et al. 2011)

Quelques études anecdotiques démontrent que le personnel médical peut être également réservoir et vecteur potentiel de *P. aeruginosa*. Une étude a décrit une épidémie liée à des ongles artificiels et une autre rapporte une épidémie liée à la colonisation chronique de l'ongle du pouce d'une infirmière. Par ailleurs, la fréquence relative de l'origine endogène des souches responsables des infections varie considérablement en fonction des services de soins (Cabrolier, Lafolie et al. 2014).

2.2. Épidémiologie des infections

Au cours des dernières décennies, *P. aeruginosa* s'est imposé en milieu hospitalier comme un pathogène opportuniste majeur, fréquemment responsable d'infections nosocomiales. Selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales réalisée en France en 2012 *P. aeruginosa* est la troisième bactérie responsable d'infections nosocomiales, après *E.coli* et *S.aureus*, soit à l'origine de 8,4 % des infections nosocomiales. Au sein des pneumopathies, il représente, avec 18,1 %, la première cause bactérienne. Les pneumopathies, les infections urinaires et les infections du site opératoire représentent au total 67 % des sites d'isolement de *P. aeruginosa* (Raisin, 2012). Elle joue un rôle majeur dans les infections broncho-pulmonaires (20,5 %), notamment chez les patients ventilés, et à un degré moindre dans les infections urinaires (13,8 %) et les bactériémies (9,2 %) (Raisin, 2012-Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (www.cclinparisnord.org/Inciso/RappRAISIN2012)).

Peu d'études épidémiologiques en relation avec *P.aeruginosa* sont menées en Algérie.

Une enquête de prévalence a été réalisée entre 2001 à 2005 au centre hospitalier universitaire de Blida, l'objectif de l'étude était d'estimer la prévalence des infections et de suivre les tendances évolutives. Sur le plan microbiologique les résultats obtenus ont montré que 77.2%

des infections sont dues à des bacilles Gram négatif sans préciser les espèces identifiés (Atif, Bezzaoucha et al. 2006).

Ainsi, une enquête de prévalence portant sur l'ensemble des malades hospitalisés a été réalisée au CHU de Bab El Oued à Alger pour apprécier l'ampleur des infections nosocomiales, les infections de plaies opératoires étaient les plus fréquentes, et les bacilles à Gram négatif ont constitué 65,4 % des bactéries incriminées (Atif, Bezzaoucha et al. 2006).

Une étude épidémiologique menée à l'unité de réanimation néonatale et pédiatrique de l'hôpital d'enfants de Tunis, a montré que les bacilles à Gram négatif étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (68 %) et étaient dominés par *Klebsiella pneumoniae* (22,7 %), suivi par *Staphylococcus aureus* (20 %). *Pseudomonas aeruginosa* était le germe prédominant des pneumopathies (28.6%) (Ben Jeballah, Bouziri et al 2006) .

En 2003, Un épisode épidémique d'infections urinaires à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant aux antibiotiques notamment à l'imipénème s'est déclaré à l'unité de réanimation chirurgicale du service d'urologie de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, posant de sérieux problèmes thérapeutiques. Une enquête épidémiologique a révélé la présence de la souche épidémique dans plusieurs endroits de cette unité (Ben Jaballah, Bouziri et al. 2006).

Selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti infectieux en établissements de santé, entre Mai à Juin 2012, *P.aeruginosa* a occupé la troisième place avec une fréquence de 8.4% après *E.coli* (26,0%, et *S.aureus* (15,9%).

En 2013, ce pathogène opportuniste représentait la première cause d'infections nosocomiales (INs) en réanimation (15 % des cas), devant le *staphylocoque doré*.

Une étude multicentrique de prévalence a été menée dans 27 hôpitaux en Algérie, en Égypte, en Italie, au Maroc et en Tunisie afin d'évaluer la prévalence et les caractéristiques des infections nosocomiales a montré que les bactéries les plus fréquemment isolés étaient *E.coli* (17,2 %), *S.aureus* (12,5 %), et en troisième place *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* (9,2 % chacun) (Amazian, Rossello et al. 2010).

2.3. Epidémiologie de la résistance de *P.aeruginosa*

Des épidémies hospitalières liées à des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes sont de plus en plus souvent rapportées. Certaines souches sont même décrites comme toto-résistantes, dès lors qu'elles ne sont plus sensibles qu'à un seul antibiotique peu utilisable en clinique : la colistine.(Wang, Jerng et al. 2006).

Synthèse bibliographique

La résistance aux ATB chez ce pathogène est intégrée au protocole de surveillance du réseau européen depuis 2005. Cette surveillance porte sur les cinq principales molécules (ou famille de molécules) d'ATB actives sur cette bactérie : PIP+/- tazobactam, ceftazidime, carbapénème, aminosides, et fluoroquinolones (Wang, Jerng et al 2006).

La prévalence de la multirésistance parmi les souches de *P. aeruginosa* est relativement faible en dehors des patients atteints de mucoviscidose, mais varie largement avec le lieu. En effet, selon les données du rapport établi en 2008 par l'EARSS (EARS-Net, 2012), les souches multirésistantes de *P. aeruginosa* (souches résistantes à au moins trois classes majeures d'antibiotiques) représentaient 17 % des 8252 isolats provenant de 32 pays en 2008 (EARS-Net, 2006).

Le phénotype majeur (6 % des isolats) correspondait à une résistance aux cinq classes d'antibiotiques incluses. Selon les auteurs, il existe un gradient géographique de la résistance, commun à celui retrouvé chez les autres bactéries à Gram négatif : faible dans le Nord et plus élevé dans le Sud de l'Europe (Bertrand, Slekovec et al. 2011).

En 2009, la France a connu une forte augmentation de la proportion de résistance à la ceftazidime chez *P.aeruginosa* (Bertrand, Slekovec et al. 2011).

En 2011, elle reste parmi les 10 pays d'Europe rapportant une proportion de résistance située entre 10 et 25% (16%). Quatre pays rapportent une proportion supérieure à 25% dont un supérieur à 50% (Roumanie mais avec seulement 6 souches). Au total, seuls 15 pays affichent en 2011 une proportion de résistance à la ceftazidime chez *P.aeruginosa* inférieure à 10%. Une augmentation significative de la résistance à la CAZ sur la période 2008 à 2011 est retrouvée dans 2 pays, dont la France. Une diminution significative est retrouvée pour Malte et la République Tchèque qui avaient en 2008 des proportions entre 30 et 50% (antibiotiques 2014).

La proportion de la résistance aux carbapénèmes (imipénème ou méropénème selon la molécule testée en routine dans les pays participants) est élevée dans tout l'Europe. Principalement entre 10 et 25% incluant la France. Pour l'ensemble des pays participants 34.7% des souches de *P.aeruginosa* sont résistantes à au moins un ATB et 15.7% à au moins 3 classes d'ATB (antibiotiques 2014).

En Algérie les taux de résistance globale de *P.aeruginosa* sont les suivants :

Pseudomonas aeruginosa résistant à l'imipénème est de 12.5%

Pseudomonas aeruginosa résistant à la ceftazidime est de 15.5%

Pseudomonas aeruginosa résistant à la ciprofloxacine est de 8.57%

Par contre on ne révèle que 8.57% de *P.aeruginosa* résistant à l'imipénème parmi les souches de cette espèce isolée en réanimation selon le 17ème rapport d'évaluation du réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux ATB, 2014. La surveillance épidémiologique des résistances aux antibiotiques montre, ces dix dernières années une augmentation de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques. Pourtant, ces chiffres globaux reflètent peu la problématique des souches multirésistantes, c'est-à-dire présentant des résistances associées à au moins 3 classes d'antibiotiques. Il existe dans notre pays un fond significatif, de l'ordre de 10 % de souches multirésistantes, voire toto-résistantes, pour les quelles la colistine reste souvent la seule molécule active, compliquant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients infectés.

Cette constatation doit entraîner une vigilance extrême du biologiste au moment de la lecture de l'antibiogramme, afin de mettre en routine des tests complémentaires ou à défaut, de confier la souche à un centre de référence. La difficulté de détection de ces souches est un élément contribuant à leur dissémination.

3. Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

P. aeruginosa est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques et par son aptitude à l'acquisition de nouvelles résistances vis-à-vis de composés habituellement actifs. Les principales familles d'antibiotiques présentant un intérêt thérapeutique sont les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Bert, et al. 2000).

3.1. Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes constituent la famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée dans le traitement des infections à bactéries à Gram négatif, notamment *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa dispose pour contrer l'efficacité des β -lactamines d'une quinzaine de systèmes connus à ce jour (Chen, Yuan et al. 1995; Rio, Pina et al. 2002). L'activité d'une β -lactamine est la résultante de sa pénétration à travers la paroi bactérienne, de l'affinité pour sa cible et de sa capacité à résister à l'hydrolyse par d'éventuelles β -lactamases. Parmi les mécanismes de résistance de *P.aeruginosa* aux β -lactamines, nous distinguerons ici ceux appartenant à la résistance naturelle de ceux appartenant à la résistance acquise.

3.1.1. Résistance naturelle

P.aeruginosa est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques (à certaines β -lactamines, mais également aux glycopeptides, macrolides, tétracyclines, acide nalidixique, chloramphénicol et triméthoprime). Les mécanismes participant à cette résistance naturelle aux β -lactamines sont au nombre de trois, fréquemment regroupés sous l'appellation de « résistance intrinsèque » de *P. aeruginosa* aux β -lactamines : l'imperméabilité relative de la membrane externe, la présence de systèmes d'efflux actif et la production d'une β -lactamase chromosomique de classe C spécifique de cette espèce bactérienne.

3.1.1.1 Imperméabilité de la paroi

La structure de la paroi externe de *P. aeruginosa* est semblable à celle de toute autre bactérie à Gram négatif, elle constitue une barrière semi-perméable qui s'oppose à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives. Cependant, la perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* était 10 à 100 fois plus faible, elle n'est perméable qu'à 8% par rapport à la membrane externe d'*Escherichia coli* (Hancock and Brinkman 2002). Ceci est la conséquence des propriétés particulières de certaines protéines de la paroi de *P. aeruginosa* : les porines, initialement appelées 'OMP' pour « outer membrane proteins » (Nikaido, Nikaido et al. 1991), et du fait que cette espèce bactérienne possède un nombre peu élevé de ces protéines dans sa membrane externe (Satake, Yoneyama et al. 1991). L'analyse du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier 163 protéines de la membrane externe (OMPs ; Outer Membrane Proteins), dont 72 sont regroupées en trois grandes familles de porines (Hancock and Brinkman 2002).

Or, les porines sont des canaux hydrophiles transmembranaires, permettant le passage sélectif de petites substances hydrophiles à travers la membrane externe, vers l'espace périplasmique comme vers le milieu extérieur. Elles représentent donc la voie de passage privilégiée des β -lactamines (ainsi que des fluoroquinolones hydrophiles).

Contrairement aux autres molécules, les carbapénèmes n'utilisent pas la porine majoritaire OprF (*outer membrane protein F*) pour pénétrer dans la bactérie, mais une porine spécifique dénommée OprD (*outer membrane protein D*), probablement due à une analogie de structure existant entre les acides aminés basiques et la chaîne latérale de l'imipénème (Huang, Jeanteur et al. 1995).

La résistance à l'imipénème est apparue juste après le début de l'utilisation clinique de cette molécule en 1987 (Li, Luo et al. 2012). Elle a été rapidement liée à l'absence d'une protéine de la membrane externe de 45–~49 kilo Dalton (kDa), (Li, Luo et al. 2012), l'OprD qui a été perdue sous l'effet de mutations chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème (Hancock and Brinkman 2002). En comparaison avec l'imipénème, les autres carbapénèmes, le méropénème et le doripénème, sont moins affectées par la déficience de l'OprD (Ocampo-Sosa, Cabot et al. 2012). Cette β -lactamine ressemble fortement à un dipeptide contenant un résidu chargé positivement. La porine OprD est une porine spécifique qui se lie à des acides aminés basiques tels que l'histidine, la lysine et l'arginine, des dipeptides contenant un résidu basique, l'imipénème et gluconate (Huang, Jeanteur et al. 1995). En effet, la résistance aux carbapénèmes résultant de la perte de la porine OprD nécessite la présence d'AmpC inductible ou dérégulée de manière stable (Livermore 1992). Une étude en Tunisie rapporte que la résistance aux carbapénèmes des souches cliniques de *P. aeruginosa* était due à deux mécanismes combinés : une diminution de la transcription du gène de l'*oprD* et une hyper expression du système d'efflux *MexAB-OprM* (Hammami, Ghozzi et al. 2009).

3.1.1.2. Systèmes d'efflux actif

Contrairement à ce qui était admis depuis longtemps, la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux β -lactamines ne peut être imputée uniquement à la faible perméabilité de sa membrane externe. En effet, il a été récemment montré que des systèmes naturels d'efflux actifs sont insérés dans la paroi et permettent à *P. aeruginosa* d'expulser des antibiotiques appartenant à plusieurs familles, dont les β -lactamines (Li, Mima et al. 2003).

Ce sont des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur (Piddock 2006). Ces systèmes de pompes nécessitent la juxtaposition d'un transporteur (une protéine associée à la membrane cytoplasmique) et d'un canal localisé dans la membrane externe afin de permettre l'excrétion d'une molécule indésirable du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en transitant par le périplasme (Nikaido 1996).

De nombreuses pompes d'efflux ont été décrites chez *P. aeruginosa* qui sont désignées d'après leurs composants respectifs avec dans l'ordre : la protéine de fusion membranaire, la pompe et la protéine de membrane externe (*MexAB-OprM* ; *MexCD-OprJ* ; *MexEF-OprN* et

Synthèse bibliographique

MexXY-OprM) (Poole, Krebs et al. 1993; Li, Nikaido et al. 1995; Poole, Tetro et al. 1996; Kohler, Michea-Hamzehpour et al. 1997; Poole 2001). Ces systèmes d'efflux ne sont pas exprimés de la même façon ; *MexAB-OprM* et *MexXY-OprM* sont produites constitutivement chez les souches de *P. aeruginosa*, alors que les deux autres systèmes d'efflux sont réprimés dans les souches sauvages (Masuda, Sakagawa et al. 2000).

En plus de leur rôle dans la résistance naturelle, les pompes d'efflux *MexAB-OprM* et *MexXY-OprM* peuvent contribuer, lorsqu'elles sont surproduites, à accroître la résistance de la bactérie à plusieurs familles d'antibiotiques. Ce phénomène est lié à la survenue de mutations spontanées dans les gènes régulateurs de ces systèmes.

MexAB-OprM, *MexCD-OprJ*, et *MexXY-OprM* confèrent une résistance aux β -lactamines (Poole 2011). Ainsi, la surproduction de *MexAB-OprM* entraîne une diminution de sensibilité à la plus large gamme de β -lactamines (parmi ces pompes) et est le plus souvent liée à la résistance aux β -lactamines chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie (Drissi, Ahmed et al. 2008) ainsi que d'autre pays de la Méditerranée dont la Tunisie (Hammami, Ghazzi et al. 2009), l'Égypte (Gad, El-Domany et al. 2007) et la France (Boutoille, Jacqueline et al. 2009). En effet, la surproduction des systèmes d'efflux *MexEF-OprN*, *MexCD-OprJ*, et *MexXY-OprM* peut être active sur les carbapénèmes sauf l'imipénème (Poole 2011). Pourtant, le système d'efflux *MexAB-OprM* semble avoir une contribution mineur à la résistance aux carbapénèmes dans cet organisme et fonctionne généralement en association avec d'autres mécanismes (Hammami, Ghazzi et al. 2009) (Poole 2011; Lee and Ko 2012).

MexAB-OprM a été également impliqué dans la résistance à la ticarcilline et son expression est liée statistiquement à la résistance à l'aztréonam (Hocquet, Roussel-Delvallez et al.). La surproduction des systèmes *MexCD-OprJ* et *MexXY-OprM* entraîne la résistance aux β -lactamines zwitterioniques (céfépime, cefpirome) (Masuda, Sakagawa et al. 2000; Livermore 2002).

On peut cependant noter dès à présent que trois antibiotiques semblent être des substrats privilégiés de ces pompes : la tétracycline, le chloramphénicol et la norfloxacine (Blair, Richmond et al. 2014).

3.1.1.3. La céphalosporinase chromosomique de *P. aeruginosa* : β -lactamase de classe C

P. aeruginosa comme *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ou encore *Serratia marscecens*, possède une β -lactamase chromosomique typique de l'espèce dont l'existence est connue depuis plus de trente ans. Cette enzyme, souvent appelée "céphalosporinase chromosomique" de par la spécificité de son spectre de substrat, appartient à la classe moléculaire C de Ambler (Ambler, Coulson et al. 1991), déterminée par la présence de trois éléments de structure primaire conservés. Elle est codée par le gène *ampC* (Lodge, Minchin et al. 1990), existant également chez la plupart des entérobactéries, dont l'expression est régulée par au moins quatre gènes : *ampR*, *ampG*, *ampD* et *ampE*. Un modèle a été proposé pour tenter d'expliquer la régulation de l'expression du gène *ampC* chez les entérobactéries (Jacobs, Huang et al. 1994), et il est probable que ce modèle puisse également s'appliquer à *P. aeruginosa*, même si certains éléments de ce système de régulation semblent différents chez cette espèce. Produite à un niveau basal, cette enzyme participe à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* vis-à-vis des β -lactamines (Campbell, Ciofu et al. 1997). En effet, cette enzyme est normalement produite à bas niveau du fait de l'action limitée d'*AmpR* activateur de la transcription d'*ampC* réprimé dans des conditions normales, mais sa production est également inductible par certaines β -lactamines comme les carbapénèmes et la céfoxitine, ou encore l'acide clavulanique (Jeannot and Plésiat. 2016). Dans les conditions d'induction, *AmpR* agit comme un activateur fort car il est déréprimé, la résistance touche alors l'ensemble des β -lactamines, à l'exception des oxyiminocéphalosporines les plus récentes (céfépime et cefpirome) et des carbapénèmes (imipénème et méropénème). Cependant, l'induction est un phénomène temporaire réversible, contrairement à l'hyperproduction constitutive que nous détaillerons dans le chapitre suivant. Par ailleurs, il faut rappeler ici que l'activité de ce type de β -lactamases n'est pas inhibée par l'acide clavulanique.

3.1.2. Résistance acquise

Nous venons de voir que *P. aeruginosa* était naturellement résistant à de nombreux antibiotiques. Outre cette résistance intrinsèque, *P. aeruginosa* est également capable de développer un certain nombre de stratégies pour acquérir des moyens de résistance renforcés ou supplémentaires afin de faire face aux agressions que représentent les antibiothérapies. Les principaux mécanismes de résistance acquise aux β -lactamines peuvent être divisés en mécanismes de nature enzymatique et de nature non enzymatique.

3.1.2.1. Résistance non enzymatique

A l'exception de la résistance isolée aux carbapénèmes par perte de la porine OprD, la résistance non enzymatique aux β -lactamines résulte d'un ensemble complexe de mécanismes. Il s'agit essentiellement de mécanismes d'efflux actifs et d'imperméabilité. Les résistances par modification du lipopolysaccharide ou perte d'affinité de la cible (PLP) sont très rares chez *P. aeruginosa*.

- **Imperméabilité de la membrane externe**

déficit en porine D2 L'exemple de la résistance de *P. aeruginosa* aux β -lactamines par modification des porines le plus connu est celui de l'acquisition de la résistance à l'imipénème par diminution de l'expression de la porine *OprD*, anciennement dénommée D2 (Trias and Nikaido 1990). Ce phénomène survient généralement suite à une antibiothérapie incluant l'imipénème, et durant laquelle des mutants de perméabilité sont sélectionnés (Quinn, Dudek et al. 1986). Un déficit en porine D2, associé à une hydrolyse partielle par la céphalosporinase AmpC, se traduit donc par une résistance isolée à l'imipénème (Livermore 1992). Ce phénomène représente la principale cause de résistance à l'imipénème chez cette espèce (Hammami, Ghazzi et al. 2009). Il est alors impossible et inutile d'augmenter les doses d'imipénème, compte tenu de sa toxicité neurologique à forte dose. L'imipénème perd alors l'avantage qu'il possède sur les autres β -lactamines,

- **Par surexpression d'un système d'efflux**

Sous l'effet de mutations sélectionnées suite à une antibiothérapie, les systèmes d'efflux actifs peuvent être surproduits, et entraîner une augmentation significative du niveau de résistance (CMI multipliées par un facteur 4 à 8) de *P. aeruginosa* à différents antibiotiques, dont les β -lactamines. Cependant, pour les trois systèmes d'efflux actifs décrits chez *P. aeruginosa*, les inducteurs naturels restent inconnus.

Plusieurs mutations ont été décrites comme étant à l'origine de la surexpression du système *MexA-MexB-OprM*: substitution d'acides aminés dans le répresseur *MexR* (Poole, Tetro et al. 1996; Cavalcanti, Mirones et al. 2015), protéine tronquée suite au décalage du cadre de lecture du gène *mexR* (Aires, Pechere et al. 2002; Li, Plesiat et al. 2015), ou mutations affectant d'autres gènes régulateurs n'appartenant pas à l'opéron *MexAB-OprM*, tels que *mexR* (également appelé *nalB*) ou *cfxB* codant pour des régulateurs transcriptionnels de l'opéron (Masuda, Sakagawa et al. 1995). La surexpression de ce système d'efflux se traduit alors par un profil de résistance particulier, lié à la surexpression de la protéine *OprM* (Wong,

Poole et al. 1997), et le distinguant de la surproduction des deux autres systèmes d'efflux (*MexCD-OprJ* et *MexEF-OprN*) existant chez *P.aeruginosa*, notamment par la résistance aux β -lactamines (carbénicilline), aux fluoroquinolones, au triméthoprim, au chloramphénicol, aux tétracyclines et à la novobiocine (Masuda, Sakagawa et al. 1995). La surexpression de ce système est le phénomène le plus important dans la résistance acquise liée à l'efflux, puisqu'il s'agit du seul système d'efflux actif produit de façon constitutive chez *P. aeruginosa*. De plus, *MexAB-OprM* est le système touchant le plus grand nombre de β -lactamines, y compris les associations β -lactamine-inhibiteur de β -lactamase (Li, Zhang et al. 1998). Ce phénomène était en fait connu depuis de nombreuses années sous le terme de "résistance intrinsèque à la carbénicilline", bien que touchant d'autres antibiotiques que ce dernier. L'expression des deux autres systèmes d'efflux (*MexCD-OprJ* et *MexEF-OprN*) est totalement réprimée à l'état normal. Néanmoins, l'expression peut également avoir lieu sous l'influence de diverses mutations au niveau des gènes régulateurs de la transcription *nfxB* (Masuda, Sakagawa et al. 1995; Poole, Tetro et al. 1996), *nfxC* et *mexR* (Gotoh, Itoh et al. 1994; Gotoh, Tsujimoto et al. 1998) des opérons *MexC-MexD-OprJ*, *MexE-MexF-OprN* et *mexA-mexB-OprM*, respectivement. Ces systèmes surproduits présentent également des spécificités de substrat : nouvelles céphalosporines (céfépime et cefpirome), fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracyclines, et érythromycine pour *MexCD-OprJ* ; fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracyclines et imipénème pour *MexEF-OprN*. Toutefois, la résistance à l'imipénème liée à la surexpression de ce dernier système résulte, en fait, de la diminution de l'expression de la porine *OprD* (D2) observée dans de tels mutants (Masuda, Sakagawa et al. 1995).

- **Modification des PLPs**

Très répandue et très étudiée chez les bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (Ghuysen 1998; Hakenbeck and Coyette 1998), la résistance acquise aux β -lactamines par mutation ponctuelle ou disparition d'une PLP, entraînant une diminution d'affinité des β -lactamines pour leurs cibles, reste un phénomène relativement rare chez *P. aeruginosa*, bien qu'il ait été décrit pour les PLPs 3 et 4 chez quelques souches d'origine clinique hébergées par les patients atteints de mucoviscidose ou de pneumonie (Bellido, Veuthey et al. 1990; Gotoh, Tsujimoto et al. 1998). Ce phénomène se caractérise par un haut niveau de résistance aux carboxy et uréido-pénicillines indépendamment de la production de β -lactamases. Nous ne développerons pas davantage ce

mécanisme de résistance acquise dont l'importance clinique, en termes de représentativité, reste à démontrer.

3.1.2.2. Résistance enzymatique

En fonction de leur structure primaire, les β -lactamases ont été regroupées en quatre classes de A à D selon la classification d'Ambler (Ambler 1980). Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active, seule la classe B regroupant les métallob-lactamases (MBLs), nécessitent les ions Zn^{++} pour leur activité et sont inhibées par les chélateurs d'ions comme l'EDTA et non par les inhibiteurs classiques de β -lactamases (Bush and Jacoby 2010). L'enzyme AmpC, les BLSEs (β -lactamases à spectre étendu) et les MBLs (métallob-lactamases) ont un impact thérapeutique majeur chez *Pseudomonas aeruginosa* (Mérens, Delacour et al. 2011).

La surexpression d'un gène codant pour une β -lactamase est l'un des moyens que peut développer la bactérie afin de résister aux β -lactamines (Chopra 1998). Ce phénomène apparaît fréquemment, de façon consécutive à un traitement antibiotique incluant une β -lactamine qui est un mauvais inducteur (C3G). Il y a alors sélection de variants résistants devenu hyperproducteurs de la β -lactamase chromosomique de *P. aeruginosa*, et élimination des bactéries dans les quelles la synthèse d'*AmpC* a été faiblement induite. L'expression du gène *ampC* étant inductible, l'enzyme inactive la plupart des pénicillines et des céphalosporines. Cependant, diverses mutations peuvent entraîner la dérégulation permanente et stable du gène *ampC*. Ces mutations peuvent toucher le gène *ampC* lui-même ou les gènes qui rentrent dans sa régulation (Nordmann 2003), en induisant une résistance à toutes les β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes. Les céphalosporines de 4e génération (céfépime, cefpirome), bien que théoriquement plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse par céphalosporinases, sont rarement efficaces sur des souches surexprimant le gène *AmpC*, car l'association d'un certain niveau de résistance naturelle au céfépime/cefpirome associée à l'hyper-expression de *AmpC* compromet totalement l'efficacité de ces molécules (Livermore 2002; Rossolini and Mantengoli 2005). Egalement, un tel phénomène combiné à une perméabilité déficiente puisse entraîner la résistance à l'imipénème (Lee and Ko 2012).

Contrairement aux entérobactéries, le gène codant *AmpC* chez *P. aeruginosa* n'a jamais été identifié sur des plasmides. Actuellement, la surproduction de céphalosporinases constitue le mécanisme de résistance à la ceftazidime le plus fréquemment retrouvé chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées dans divers pays de la Méditerranée (Garcia-Rodriguez and

Synthèse bibliographique

Jones 2002; Kalai, Jouaihia et al. 2004; Drissi, Ahmed et al. 2008; Dubois, Arpin et al. 2008; El-Mahdy 2014). L'existence d'une β -lactamase induite de type *AmpC* à déterminisme chromosomique (céphalosporinase) permet à l'espèce de développer une résistance efficace par surproduction constitutive de quantité très importante de β -lactamase jusqu'à 30000 fois que celle de PAO1 (Livermore 1995). La fréquence des mutants dérégulés augmente dans les situations à forte pression de sélection antibiotique, notamment en réanimation (jusqu'à 20%) (Rio, Pina et al. 2002) ou chez les patients atteints de mucoviscidose (Livermore 1995). Outre les différents mécanismes de résistance acquise, *P. aeruginosa* peut également acquérir différentes β -lactamases grâce à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons ou intégrons). Trois groupes de β -lactamases responsables de phénotypes de résistance différents ont été identifiés. Il s'agit de carbénicillines (groupe CARB ou PSE), d'oxacillines (OXA) ou de pénicillines du groupe TEM (Figure 01).

On distingue dans la classe A d'Ambler, les pénicillines, parmi les pénicillines décrites : PSE-1 (enzyme spécifique de *Pseudomonas*) encore dénommée CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-2 et CARB-4 (Bert, Branger et al. 2002).

Toutefois, PSE-1 est la pénicilline majoritaire (90% des cas). Ces enzymes sont étroitement liées, la seule différence est 1 ou 2 acides aminés. Ces pénicillines hydrolysent les Carboxypénicillines, les Uréido-pénicillines et la cefsulodine, et sont inactives sur la Ceftazidime et les carbapénèmes.

Ces pénicillines à spectre restreint confèrent une résistance à la ticarcilline, la pipéracilline, la cefsulodine mais pas à la ceftazidime ni à l'imipénème (Mérens, Janvier et al. 2012).

La première PSE-1 en Afrique du nord a été rapportée en Tunisie par *Ktari et ses collaborateurs* (Ktari, Mnif et al. 2011).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) appartiennent aux classes A ou D d'Ambler sont spécifiquement définies comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les Carboxypénicillines et les uréido-pénicillines, les mutations génétiques à l'origine de ces BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime, céfépime, cefpirome) et l'aztréonam et sont inhibées par l'inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique (Weldhagen, Poirel et al. 2003). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les Céphamycines (Céfoxitine) ni les Carbapénèmes (Vora and Auckenthaler 2009).

Les BLSEs de la classe A d'Ambler ont été largement rapportées chez les entérobactéries depuis 1980, alors qu'elles n'ont été décrites que plus récemment chez *P. aeruginosa*

Synthèse bibliographique

(Weldhagen, Poirel et al. 2003). Les gènes codant ces enzymes sont situés sur le chromosome bactérien ou sur des éléments mobiles, expliquant la rapidité de leur diffusion (Weldhagen, Poirel et al. 2003). *P. aeruginosa* peut acquérir une β -lactamase à spectre étendu de classe A à partir d'un transfert d'ADN d'une autre espèce (Nordmann and Naas 1994). Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSEs étaient dérivées de TEM et SHV apparues chez *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Sirot, Sirot et al. 1987; Bure, Legrand et al. 1988). Cinq types de BLSE de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été détectés chez *P. aeruginosa*.

L'enzyme SHV-2a a été détectée la première fois chez *P. aeruginosa* en 1995 en France chez un patient de retour de la Tunisie (Naas, Philippon et al. 1999). Par la suite, la BLSE de type SHV-5 a été identifiée dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Grèce (Neonakis, Scoulica et al. 2003; Poirel, Lebessi et al. 2004). Le gène *blaSHV-5* était chromosomique et pouvait avoir résulté du transfert d'un plasmide porteur du gène *blaSHV-5* à partir d'entérobactéries suivi de son intégration chromosomique (Legakis, Tzouvelekis et al. 1995; Poirel, Lebessi et al. 2004). Cette enzyme, SHV-5, détermine un haut niveau de résistance à la ceftazidime et aux monobactames (Strateva, Ouzounova-Raykova et al. 2007). Dans le nord de l'Afrique, la BLSE SHV-2a, à médiation chromosomique, a été rapportée chez sept souches de *P. aeruginosa* en Tunisie (Mansour, Dahmen et al. 2009). Plus récemment, 24 souches productrices de SHV-2a et une souche productrice de l'enzyme SHV-12, une variante de SHV-2a, ont été isolées au niveau de 13 hôpitaux géographiquement éloignés en France (Amiens, Auxerre, Béthune, Clamart, Lille, 2 hôpitaux de Marseille, 2 à Paris, Montreaux-Fault-Yonne, Neuilly-sur-Seine, Reims, et Versailles)(Jeannot, Fournier et al. 2013).

Entre 1992 et 1998, plusieurs souches de *P. aeruginosa* productrices de TEM ont été isolées en France : TEM-42 (Mugnier, Dubrous et al. 1996), TEM-4 (Poirel, Karim et al. 199), TEM-21 (Dubois, Arpin et al. 2002) et TEM-24 (Marchandin, Jean-Pierre et al. 2000). Ces BLSE ont un spectre d'activité équivalent à celui des TEM isolées chez les entérobactéries (C3G et Aztréonam).

En 1993, l'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance), à médiation chromosomique, a été détectée pour la première fois chez *P. aeruginosa* en France dans un isolat urinaire d'un patient turque (Nordmann and Naas 1994). Par la suite, un plasmide codant cette enzyme a été décrit (Danel, Hall et al. 1995). Une étude multicentrique menée en Turquie en 1996 a révélé une prévalence élevée de cette enzyme chez les isolats cliniques d'*Acinetobacter* spp et *P. aeruginosa* (Vahaboglu, Ozturk et al. 1997). Actuellement, il y a une large diffusion de

Synthèse bibliographique

*bla*PER-1 dans les isolats nosocomiaux de *P. aeruginosa* en Turquie (Vahaboglu, Coskuncan et al. 2001; Kolayli, Gacar et al. 2005). Des souches productrices de PER-1 ont été impliquées dans des épidémies hospitalières dans plusieurs études menées en France (De Champs, Chanal et al. 2004; Llanes, Neuwirth et al. 2006; Hocquet, Plesiat et al. 2010). Cette BLSE a été rapportée en Italie, entre 1997 et 1998 (Luzzaro, Mantengoli et al. 2001), et plus récemment en Grèce (Ranellou, Kadlec et al. 2012). La seule description de PER-1 en Afrique du nord a été rapportée en Tunisie (Ktari, Mnif et al. 2011)(Fig.1).

Une autre BLSE ne dérivant pas des types TEM et SHV, l'enzyme VEB (Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase). VEB-1 a été détectée la première fois chez *P. aeruginosa* en 1998 en France (Naas, Poirel et al. 1999) et plus récemment chez une seule souche (Hocquet, Plesiat et al. 2010). Cette enzyme a été rapportée comme étant épidémique en Bulgarie (Strateva, Ouzounova-Raykova et al. 2007; Vatcheva-Dobrevska, Mulet et al. 2013). *bla*VEB-1 fait souvent partie d'un gène cassette situé sur un intégron de classe 1 (Poirel, Menuteau et al. 2003; Aubert, Naas et al. 2012).

A la fin du 20e siècle, une nouvelle BLSE a été décrite, GES (Guiana Extended Spectrum). GES-1 a été rapportée depuis la France (Dubois, Poirel et al. 2002), le Brésil (Castanheira, Bell et al. 2009) et l'Espagne (Viedma, Juan et al. 2009).

GES-2 dérive de la BLSE GES-1 par mutation ponctuelle. Cette BLSE codée par un plasmide conjugatif a été rapportée en Afrique du Sud (Poirel, Weldhagen et al. 2001; Poirel, Weldhagen et al. 2002). GES-2 peuvent conférer une résistance à l'imipénème contrairement aux enzymes GES-1 (Poirel, Weldhagen et al. 2002). En outre, l'identification de cette enzyme a montré que les BLSEs de classe A peuvent devenir des carbapénémases à faible activité, à travers la substitution d'un acide aminé (Nordmann and Poirel 2002).

De nouvelles variantes de l'enzyme GES-1 ont été rapportées. GES-5 a été isolée chez *P. aeruginosa* au Brésil, en Afrique du Sud, en Espagne (Da Fonseca, Vieira et al. 2007 ; Labuschagne Cde, Weldhagen et al. 2008; Viedma, Juan et al. 2009) et plus récemment en Turquie (Iraz, Duzgun et al. 2014). GES-9 a été rapportée en France (Poirel, Brinas et al. 2005). L'enzyme GES-9 diffère de GES-1 par une substitution Gly243Ser. Elle est inhibée par l'acide clavulanique et l'imipénème et hydrolyse l'aztréonam (Poirel, Brinas et al. 2005). Par la suite, la BLSE GES-13 a été rapportée en Grèce (Kotsakis, Papagiannitsis et al. 2010) et la BLSE GES-18 en Belgique (Bebrone, Bogaerts et al. 2013). Les gènes codant ces enzymes GES sont situés sur des intégrons de classe 1 (Poirel, Weldhagen et al. 2002).

Synthèse bibliographique

La BLSE de type IBC-2 (actuellement appelée GES-8), a été rapportée pour la première fois en Grèce dans un isolat clinique de *P. aeruginosa*, probablement à localisation chromosomique (Mavroidi, Tzelepi et al. 2001). Il s'agit d'une variante de GES-1 avec une seule substitution (Ala125Leu) (Strateva, Ouzounova-Raykova et al. 2007).

D'autres types de BLSEs de classe A d'Amblar ont été rapportés. Les BLSEs de type BEL (Belgium) ont été rapportées dans une étude multicentrique entre 2004 et 2008 en Belgique (Glupczynski, Bogaerts et al. 2010). Le gène *blaBEL-1* codant cette enzyme fait partie d'un intégrom de classe 1, In120, localisé sur un transposon chromosomique (Strateva, Ouzounova-Raykova et al. 2007).

Les BLSEs de classe D, également appelées « oxacillinases à spectre étendu » (ES-OXA), dérivent des oxacillinases classiques à spectre restreint, OXA-2 (OXA-15 et OXA-32) et de l'OXA-10 (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19 et -28) par des mutations ponctuelles (Poirel, Girlich et al. 2001). L'enzyme OXA-10 a été rapportée en Turquie (Aktas, Poirel et al. 2005), dans le nord-ouest algérien (Drissi et al., 2008) et par la suite en Tunisie (Ktari, Mnif et al. 2011)(Fig.1).

Les BLSEs de classe D sont actives sur l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. A l'exception d'OXA-18, l'activité de ces enzymes n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases. La plupart des oxacillinases à spectre étendu sont codées par des gènes présents sur des plasmides ou des intégroms (Naas, Sougakoff et al. 1998; Nordmann and Guibert 1998), ce qui contribue à leur diffusion facile et à une augmentation de leur prévalence dans le bassin méditerranéen. La majorité de ces BLSEs ont été isolées en Turquie (Hall, Livermore et al. 1993; Danel, Hall et al. 1995; Danel, Hall et al. 1997; Danel, Hall et al. 1998; Danel, Hall et al. 1999) et en France (Mugnier, Casin et al. 1998; Mugnier, Podglajen et al. 1998; Poirel, Gerome et al. 2002; Hocquet, Plesiat et al. 2010). La BLSE OXA-18 est codée par le gène chromosomique *blaOXA-18* (Philippon, Naas et al. 1997). Sa séquence en acides aminés n'est pas identique aux autres oxacillinases de classe D produites par *P. aeruginosa*. Elle a été décrite pour la première fois en France chez un patient préalablement hospitalisé en Italie (Philippon, Naas et al. 1997) et par la suite en Tunisie avec une émergence d'OXA-18 entre 1998 et 2000 (Kalai Blagui, Achour et al. 2007).

Plus récemment, une nouvelle β -lactamase de Classe D à activité carbapénémase, l'OXA-198, a été rapportée en Belgique chez les souches de *P. aeruginosa* (El Garch, Bogaerts et al. 2011).

Synthèse bibliographique

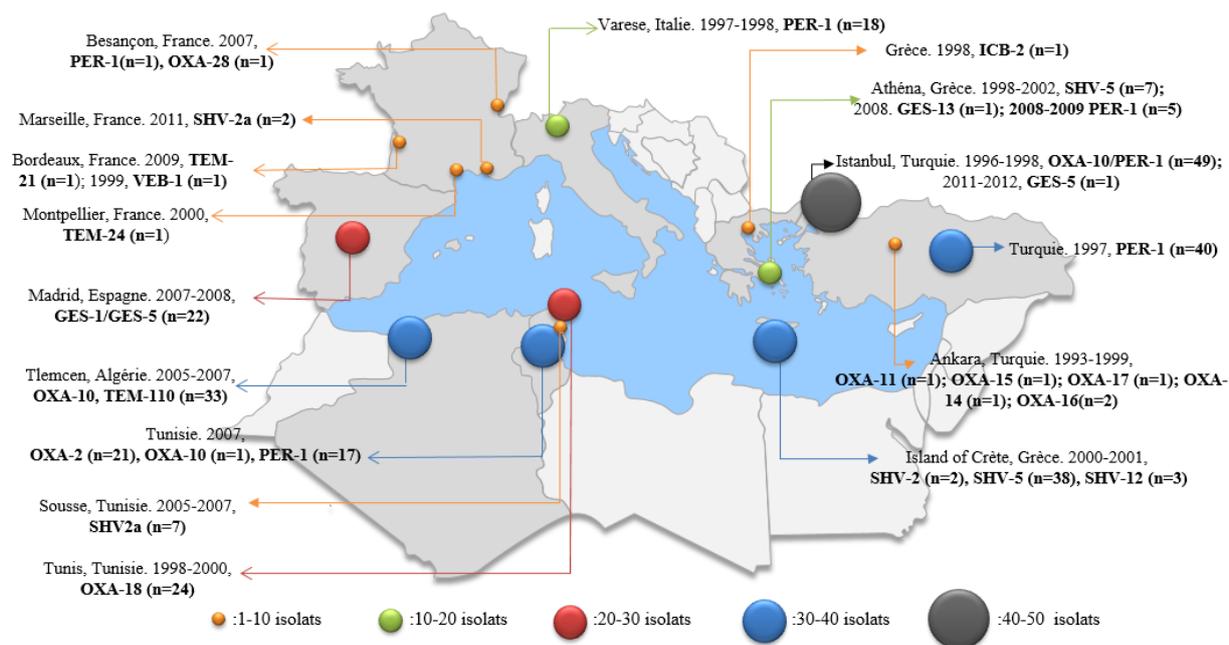


Figure 1 β -lactamases de Classe A et D rapportées chez *P. aeruginosa* dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013) (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

Les carbapénèmases sont des enzymes appartenant à la classe B d'Amblar (métallo-enzymes). Elles sont également connues sous le nom de métallo- β -lactamase (MBL). Depuis l'apparition des enzymes IMP et VIM dans les années 90 (Watanabe, Iyobe et al. 1991), les MBLs sont devenues les carbapénèmases les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes possèdent dans leur site actif un ou deux atomes de Zn^{2+} indispensables à leur activité d'hydrolyse des β -lactamines. (Nordmann and Guibert 1998). Seul le monobactam est épargné par les caractéristiques hydrolytiques des MBL. L'activité enzymatique des carbapénèmases n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif (Nordmann and Poirel 2002).

L'isolement des MBL transférables est en revanche, de plus en plus fréquent. Ces carbapénèmases acquises constituent actuellement sept groupes décrits chez *P. aeruginosa* : IMP (active sur l'IMiPenem), VIM (Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase), SPM (Sao-Paulo Metallo- β -lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase) et, plus récemment NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) et FIM-1 (Cornaglia, Giamarellou et al. 2011). Les types IMP et VIM demeurent les MBLs les plus rapportées dans le bassin méditerranéen chez *P. aeruginosa*.

La première MBL, IMP-1 a été isolé pour la première fois au Japon en 1990 sur un plasmide conjugatif dans une souche de *P. aeruginosa* (Walsh, Toleman et al. 2005; Queenan and Bush

Synthèse bibliographique

2007). Le gène a été localisé sur un plasmide de grande taille (36 kb) et faisait partie d'un gène cassette situé dans un intégron IN31 de classe 1. Par la suite, entre 2000 à 2001, d'autres variantes de la MBL, IMP, ont été rapportées dans diverses bactéries à Gram négatif à travers le monde (Strateva, Ouzounova-Raykova et al. 2007). L'Italie est le premier pays européen à avoir signalé la présence de métallo- β -lactamases acquises de type IMP à savoir, l'IMP-2, l'IMP-12 et l'IMP-13 (Cornaglia, Giamarellou et al. 2011). *blaIMP-13*, d'abord détecté dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en provenance d'Italie (Toleman, Biedenbach et al. 2003), a été impliqué par la suite dans plusieurs épidémies relativement importantes (Rossolini, Luzzaro et al. 2008). *blaIMP-1* a été rapporté en Turquie (Ozgumus, Caylan et al. 2007). Plus récemment, une souche productrice de la MBL, IMP-18, a été rapportée en France (Hocquet, Plesiat et al. 2010) et la première détection de *P. aeruginosa* productrice d'IMP-15 en Europe a été rapportée dans une étude entre 2009 et 2011 chez deux patients hospitalisés en Espagne (Gilarranz, Juan et al. 2013) et très récemment en Liban (Al Bayssari, Diene et al. 2014). IMP-13, IMP-1, IMP-18 et IMP-15 demeurent les seules MBLs de type IMP à avoir été rapportées dans les pays méditerranéens.

Parmi les MBLs, le type VIM est le plus répandu dans le monde (Cornaglia, Giamarellou et al. 2011). La carbapénèmase de type VIM-1 rapportée la première fois en Méditerranée chez une souche de *P. aeruginosa* nosocomiale isolée à l'hôpital universitaire de Vérone, en Italie, en 1997 (Lauretti, Riccio et al. 1999), a été le premier représentant de cette nouvelle famille de MBLs acquise.

Les enzymes de type VIM, notamment l'enzyme VIM-2 décrite la première fois chez un patient hospitalisé à Marseille en France (Poirel, Naas et al. 2000), sont les MBLs prédominantes dans la Méditerranée et ont été rapportés dans plusieurs pays du bassin méditerranéen, incluant les pays européens ; l'Italie (Cornaglia, Mazzariol et al. 2000; Lagatolla, Tonin et al. 2004; Riccio, Pallecchi et al. 2005; Mazzariol, Mammina et al. 2011), la Grèce (Mavroidi, Tsakris et al. 2000 ; Tsakris, Pournaras et al. 2000; Pournaras, Tsakris et al. 2002; Siarkou, Vitti et al. 2009), l'Espagne (Juan, Beceiro et al. 2008; Viedma, Juan et al. 2012), la Croatie (Sardelic, Pallecchi et al. 2003 ; Sardelic, Bedenic et al. 2012) et la Turquie (Bahar, Mazzariol et al. 2004 ; Yakupogullari, Poirel et al. 2008) ainsi que les pays d'Afrique incluant l'Algérie (Touati, Diene et al. 2013) la Tunisie (Mansour, Poirel et al. 2009; Hammami, Gautier et al. 2010; Hammami, Boutiba-Ben Boubaker et al. 2011; Ktari, Mnif et al. 2011), le Kenya (Pitout, Revathi et al. 2008) et l'Afrique de Sud (Jacobson, Minenza et al. 2012) (Fig.2).

Synthèse bibliographique

D'autres enzymes de type VIM ont été décrites dans les pays méditerranéens, à noter l'enzyme VIM-4 et VIM-17 en Grèce (Pournaras, Tsakris et al. 2002; Siarkou, Vitti et al. 2009), VIM-5 et VIM-38 en Turquie (Bahar, Mazzariol et al. ; Iraz, Duzgun et al. 2014), VIM-13 et VIM-20 en Espagne (Juan, Beceiro et al. 2008; Riera, Cabot et al. 2011), ainsi que VIM-14 en Italie (Mazzariol, Mammina et al. 2011) (Fig.2). Une nouvelle MBL de type FIM-1 a été identifiée en 2007 en Italie (Pollini, Maradei et al. 2013).

Plus récemment, une nouvelle métallo- β -lactamase, NDM-1 (New Delhi M β L), a été identifiée pour la première fois chez les souches de *P. aeruginosa*, en Serbie (Jovcic, Lepsanovic et al. 2011). Cette enzyme aurait déjà une diffusion internationale importante. En outre, 6 sur 55 cas de NDM-1 associés aux voyages rapportés en Europe avaient un lien avec la région des Balkans, sans doute la Serbie (y compris le Kosovo), le Monténégro et la Bosnie-Herzégovine (Jovcic, Lepsanovic et al. 2011). Une souche productrice de cette MBL a été détectée en France chez un patient précédemment hospitalisé en Serbie (Janvier, Jeannot et al. 2013).

Depuis quelques années, les carbapénèmases de classe A telles que les KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) qui tendent à diffuser au sein des Entérobactéries (Mérens, Delacour et al. 2011) ou encore les GES-2, restent rares chez les souches de *P. aeruginosa* et n'ont pas encore été rapportées dans les pays de la Méditerranée (Naas, Bonnin et al. 2013).

Comme pour les BLSE, le support génétique de ces enzymes est situé au sein d'intégrons en position plasmidique ou chromosomique. Ces enzymes sont redoutables car elles induisent une résistance de haut niveau à toutes les β -lactamines, à l'exception de l'aztréonam (Nordmann 2003). Fait aggravant, il s'y associe une résistance croisée constante aux aminosides. Le risque de dissémination mondiale de ces carbapénèmases chez les bacilles à Gram négatif représente un problème préoccupant. De plus, leur fréquence est très probablement sous estimée en raison des difficultés de détection (Nordmann and Poirel 2002).

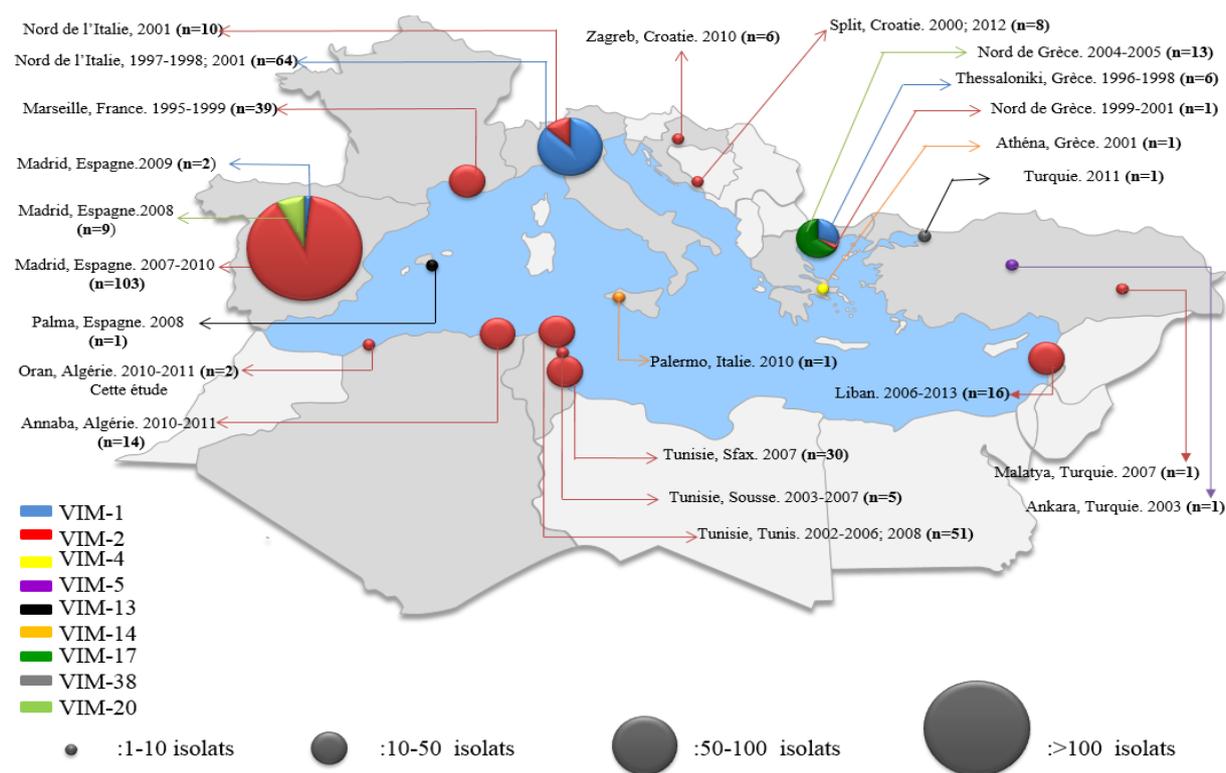


Figure 2 MBLs de type VIM rapportées chez *P. aeruginosa* dans les pays méditerranéens (Jusqu'à 2013) (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

3.2. Résistance aux aminosides

Les aminosides sont des agents antibactériens, naturels, produits par les *Actinomycetales* des genres *Streptomyces* et *Micronospora*. Ce sont des antibiotiques à usage quasi exclusivement hospitalier et qui paraissent particulièrement utiles de par leur large spectre et leur vitesse de bactéricidie et ont été traditionnellement utilisés pour le traitement de graves infections à Gram négatif (Hermann 2007). Ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse des protéines par l'intermédiaire de leur liaison au site aminoacyl de l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale 30S entraînant la destruction bactérienne (Shakil, Khan et al. 2008). Un certain nombre d'aminoglycosides sont couramment utilisés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* comme la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine. Leur utilisation est toutefois confrontée au développement de plusieurs mécanismes de résistance (Poole 2005). Il s'agit notamment de la désactivation de ces antibiotiques par la famille des enzymes-modifiant les aminosides (AMEs) agissant sur des sites spécifiques de ces aminoglycosides et représentent le mécanisme majeur de résistance à cette famille d'antibiotique. D'autres mécanismes de résistance ont été décrits, incluant, la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale, l'expulsion de

l'antibiotique par les systèmes d'efflux ainsi que la méthylation du site de liaison des aminoglycosides (Shakil, Khan et al. 2008).

Les mécanismes de résistance acquise peuvent être classés en deux catégories (Bert al. 2000) :

3.2.1. Mécanismes de nature enzymatique

Trois classes d'enzymes (AMEs) ont été décrites, à savoir les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-o-nucléotidyl transférases (AAD ou ANT) et les aminosides-o-phosphotransférases (APH). Leurs gènes étant fréquemment portés par des éléments mobiles (intégrons, plasmides ou transposons) et sont souvent associés à la résistance aux β -lactamines et aux quinolones (Ramirez and Tolmasky 2010).

Les enzymes *ANT* (*2'*-I) (détermine la résistance à la gentamicine et à la tobramycine), *AAC*(3)-I (résistance à la gentamicine), *AAC*(6')-II (résistance à la tobramycine, nétilmicine et gentamicine) et *AAC*(6')-Ib (résistance à la tobramycine et à l'amikacine) sont les plus répandues chez les isolats cliniques de *P. aeruginosa* (Strateva and Yordanov 2009). Leur production simultanée chez une même bactérie se traduit par une résistance à tous les aminosides disponibles (tobramycine, amikacine, nétilmicine et gentamicine).

L'*AAC*(6')-Ib semble être l'acétyltransférase le plus important sur le plan clinique. Son variant *AAC*(6')-Ib-cr initialement détecté chez les entérobactéries, se traduit par une sensibilité réduite aux quinolones chez *P. aeruginosa* (Libisch, Watine et al. 2008).

Une étude menée dans plusieurs pays européen incluant la Turquie, la Grèce, l'Espagne et la France, indique que le gène *aac*(6')-II était le plus répandu chez les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux aminosides, suivi par le gène *ant*(2'')-I (Miller, Sabatelli et al. 1997).

En Algérie, les gènes *aac*(3')-II, *aadA1* et *aadA13* ont été identifiés chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* associés au gène *blaVIM-2* (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014). D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés en Algérie, les gènes *aadB* et *aacA4* ont été identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase VIM-2 (Touati, Diene et al. 2013).

3.2.2. Mécanismes de nature non enzymatique

Il s'agit d'une perturbation de transport actif de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie, se traduisant par une résistance de bas niveau à l'ensemble des aminosides. Ce mécanisme de résistance aux aminosides a été décrit chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, il s'agit d'une résistance par modification de la perméabilité membranaire qui réduit la pénétration intracellulaire des aminosides. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de ce mécanisme exprimé par des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, surtout chez les patients

Synthèse bibliographique

atteints de mucoviscidose (Poole 2005). En Turquie, ce mécanisme de résistance était responsable de 66.6% de résistance aux aminosides (Over, Gur et al. 2001).

Ainsi, Chez *P. aeruginosa*, seul le système d'efflux actif *MexXY-OprM* est capable d'exporter les aminosides vers le milieu extérieur et d'entraîner une résistance non enzymatique à cette famille d'antibiotiques (Masuda, Sakagawa et al. 2000). Naturellement réprimé chez les souches sauvages, ce système peut être surproduit chez certains mutants. Il a été suggéré que la protéine *MexXY* peut agir aussi avec d'autres protéines de la membrane externe, *OpmB*, *OpmG*, et *Opml*, formant ainsi des systèmes d'efflux actifs à trois composants. Ce mécanisme de résistance aux aminosides semble être la principale cause de résistance non enzymatique à cette famille d'antibiotiques chez *P. aeruginosa* en France, en particulier parmi les isolats provenant de malades atteints de mucoviscidose (Vogne, Aires et al. 2004).

Plus récemment, la méthylation de l'ARNr 16S a émergé comme un nouveau mécanisme de la résistance aux aminosides parmi les agents pathogènes à Gram négatif telle que *P. aeruginosa*, capable de modifier non pas l'aminoside mais la structure ribosomale sur lequel il se fixe, l'ARN 16S. Le gène *RmtA* (Resistance methylase transferase) codant ce mécanisme a été décrit chez *P. aeruginosa* au Japon en 2003 (Yokoyama, Doi et al. 2003; Yamane, Doi et al. 2004). Depuis 2003, de nombreuses études ont rapporté la présence de ce nouveau mécanisme de résistance et sa propagation dans différentes espèces, dans différentes parties du monde. Ces enzymes confèrent des hauts niveaux de résistance aux aminosides cliniquement utilisés, comme l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine (Doi and Arakawa 2007).

RmtD, une nouvelle 16S ARNr méthylase, a été identifiée chez une souche de *P. aeruginosa* isolée au Brésil en 2005 et associée à la production de métallo- β -lactamase SPM-1. Cette enzyme confère un haut niveau de résistance aux aminosides (amikacine, gentamicine et tobramycine) (Doi, de Oliveira Garcia et al. 2007). La production simultanée d'une méthylase de l'ARNr 16S et d'une métallo- β -lactamase a donc pour conséquence de rendre les souches résistantes à presque tous les aminosides et toutes les β -lactamines. La coexistence de ces deux mécanismes transférables illustre comment les souches de *P. aeruginosa* peuvent évoluer rapidement vers la toto-résistance. Bien qu'ils soient encore peu répandus chez *P. aeruginosa*, les méthylases de l'ARNr 16S sont décrites de plus en plus chez les entérobactéries à travers le monde (Galimand, Sabtcheva et al. 2005).

3.3. Résistance aux fluoroquinolones

Parmi les quinolones, seules les fluoroquinolones (FQ) sont efficaces vis-à-vis de *P. aeruginosa*, la ciprofloxacine étant de loin la molécule la plus active. Ces antibiotiques ont pour cible les topoisomérases bactériennes de types II (l'ADN gyrase et la topoisomérases IV). Chacune de ces enzymes est formée de 2 sous-unités, *GyrA* et *GyrB*, *parC* et *parE*, respectivement. Les mécanismes de résistance acquise sont au moins de trois (Cambau, Perani et al. 1995):

3.3.1. Modification d'affinité de la cible

Les quinolones agissent en inhibant des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN bactérien, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Certaines mutations pouvant survenir au niveau des protéines *gyrA* et *gyrB* (sous unités A et B de l'ADN gyrase) ou de la sous unité *parC* de la topoisomérase entraînent une baisse de l'affinité pour l'antibiotique. Le niveau de résistance observé est variable selon le nombre et la localisation de ces mutations ;

3.3.2. Diminution de la pénétration de l'antibiotique

- **Efflux actif**

Les différents systèmes d'efflux actif précédemment cités pour les β -lactamines et les aminosides confèrent tous une résistance de bas niveau aux quinolones.

La surproduction des pompes d'efflux *MexAB-OprM*, *MexXY-OprM*, *MexCD-OprJ* et *MexEF-OprN* est à l'origine d'une résistance modérée aux fluoroquinolones ainsi qu'à d'autres classes d'antibiotiques (Wang, Sun et al. 2007). Un nouveau membre de la famille des pompes à efflux tripartite, *MexV* (protéine de fusion de membrane), *MexW* (de type RND protéine membranaire), *OprM*, qui confère une résistance aux fluoroquinolones, a été décrit chez *P. aeruginosa* en 2003. Ainsi, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est attribuable à l'association des surproductions de pompes à efflux et des mutations dans les gènes codant ADN gyrase et la topoisomérase IV (Nakajima, Sugimoto et al. 2002).

3.4. Colistine

Les polymyxines (polymyxine B et colistine) sont des antibiotiques polycationiques bactéricides actifs sur la plupart des bacilles à Gram négatif dont *Pseudomonas aeruginosa*.

Leur mode d'action passe par la désorganisation de la membrane externe puis de la membrane cytoplasmique. Ce mécanisme très direct ne prête guère au développement de mécanismes de

résistance. Pourtant, le bacille pyocyanique parvient dans certaines circonstances à modifier la composition de sa membrane externe de façon à la rendre imperméable à ces deux agents.

Ceci peut être obtenu, soit par des mutations, soit par l'activation de systèmes membranaires complexes appelés « systèmes de régulation à deux composants » tels que *ParRS*. Dans les deux cas, il en résulte une résistance de bas niveau (CMI multipliée par 2 à 8) suffisante pour compromettre un traitement par voie intraveineuse ou en aérosol. Ceci a conduit à l'apparition de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux polymyxines signalées à travers le monde entier (Landman, Bratu et al. 2005; Lee, Song et al. 2011), y compris la Méditerranée en Grèce (Falagas, Rafailidis et al. 2008).

L'identification des mutants résistants repose sur la détermination de la CMI de la colistine par une méthode de dilution, en milieu liquide ou en milieu solide. La mauvaise diffusion de cet antibiotique (le seul utilisé en thérapeutique) dans les géloses rend ininterprétables les résultats obtenus par la méthode des disques. Il n'y a donc pas de correspondance entre le niveau de sensibilité d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à la colistine et le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de cet antibiotique.

4. Facteurs de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence dits cellulaires, c'est-à-dire associés à la bactérie et principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité et ceux dits extracellulaires, correspondant aux toxines et protéases sécrétées agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement (Ben Haj Khalifa, Moissenet et al. 2011). *Pseudomonas aeruginosa* utilise ainsi plusieurs systèmes de sécrétion pour mettre en contact les toxines produites et les cellules. Les quatre systèmes de sécrétion, ubiquitaires chez les bactéries à Gram négatif, ont été décrits chez *P. aeruginosa*. Deux de ces systèmes sont particulièrement impliqués dans la pathogénicité de la bactérie.

Le système de sécrétion de type II secrète des exoproduits (toxines et enzymes) dans l'environnement proche des cellules. Les protéines concernées sont des ATPases, des protéines chaperones et des peptidases. Parmi celles-ci, l'élastase, la phosphatase alcaline, l'exotoxine A et la phospholipase C participent à la cytotoxicité et à l'invasion tissulaire par destruction du mucus protecteur recouvrant l'épithélium bronchique.

Le système de sécrétion de type III, activé lors du contact cellulaire, permet une injection des toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Kipnis, Sawa et al. 2006). La

translocation des toxines depuis la bactérie s'effectue par le biais d'un appendice traversant la membrane bactérienne et capable de percer la membrane de la cellule eucaryote.

4.1 Facteurs de virulences cellulaires

Les membranes cellulaires présentent de nombreux glycoconjugués, marqueurs et récepteurs potentiels de la cellule considérée. Ces molécules sont capables d'interagir de manière plus ou moins spécifique avec des protéines ou des glycoprotéines de type lectine. Ces lectines peuvent être bactériennes, virales, végétales ou animales. L'adhésion bactérienne aux cellules de l'hôte est généralement la première étape du processus infectieux. Les adhésines participant à cette phase sont ainsi capables d'interférer avec le système immunitaire, de participer à l'introduction de molécules toxiques dans la cellule hôte, de favoriser l'invasion bactérienne et sont donc considérées comme des facteurs de virulence. Elles peuvent être associées aux fimbriae, aux toxines ou être libres en solution.

4.1.1. Flagelle et pili

La mobilité en liaison avec les variations de l'environnement est un phénomène primordial dans le processus de colonisation et d'infection. Les bactéries sont ainsi dotées d'appendices cellulaires, flagelles et pili (ou fimbriae), leur permettant de « sonder » les surfaces et de se déplacer dans le milieu.

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité de type "swimming" mais qui intervient également dans la mobilité de type "swarming" (Kohler, Curty et al. 2000). L'implication du flagelle dans la pathogénicité de nombreuses bactéries pathogènes, comme *P. aeruginosa*, a déjà été bien établie. (Kohler, Curty et al. 2000). Il présente une forte homologie structurale avec le système de sécrétion de type III et se compose d'une partie enchâssée dans la membrane assurant la rotation par transport de protons et une partie libre. Celle-ci est constituée en partie de monomères de flagelline (FlicC) (Bardy, Ng et al. 2003). Le flagelle est impliqué dans la reconnaissance et l'adhérence aux surfaces épithéliales (Simpson, Ramphal et al. 1992) et abiotiques, ainsi qu'à la formation de microcolonies et au développement « normal » d'un biofilm (O'Toole and Kolter 1998). Des mutants dépourvus de flagelle ont ainsi une virulence atténuée (Feldman, Bryan et al. 1998). Cependant, lors d'infections chroniques, et notamment au cours de la formation du biofilm, *P. aeruginosa* est capable de sélectionner des mutants non-flagellés pour échapper aux défenses de l'hôte (Mahenthiralingam, Campbell et al. 1994).

La mobilité implique également les pili de type IV. Le pilus de type IV est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales, il est constitué essentiellement de monomères de piline (PilA), (Hahn 1997). Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type "twitching" (Wall and Kaiser 1999) et de type "swarming" (Kohler, Curty et al. 2000), permettant une dispersion sur les surfaces humides (Mattick 2002). Ils sont également connus pour jouer un rôle crucial dans l'adhérence aux surfaces muqueuses et leur colonisation (Hahn, Lane-Bell et al. 1997). Une altération de ces pili conduit à une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales in vitro (Hahn 1997; Comolli, Hauser et al. 1999). Ces constituants bactériens cellulaires sont nécessaires pour l'expression de la virulence de *P. aeruginosa* dans un certain nombre de modèles infectieux (Cryz, Furer et al. 1983; Holder 1985; Tang, DiMango et al. 1996; Feldman, Bryan et al. 1998). De nouveaux appendices de surface de la famille des pili de type IV-b ont été récemment mis en évidence (De Bentzmann, Aurouze et al. 2006).

Un nouveau facteur d'attachement a été récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type *fimbriae* qui sont assemblés par la voie "chaperone/usher/pathway" (Cup) (Vallet, Olson et al. 2001). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés (Vallet, Olson et al. 2001; Lazdunski 2003). Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm. Les domaines terminaux présentent des homologies avec des adhésines de souches uropathogènes d'*E.coli*. (Vallet, Olson et al. 2001).

4.1.2. Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, localisé dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif est également présent chez *P.aeruginosa*. D'une part, il est connu pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et, d'autre part, pour son activité endotoxique. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes. La molécule de LPS peut être divisée en trois parties (Rocchetta, Burrows et al. 1999) :

- le lipide A, aussi appelé endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Lynn and Golenbock 1992).
- le cœur oligosaccharidique.
- l'antigène O qui est une région polysaccharidique variable.

P. aeruginosa est capable de synthétiser deux formes de LPS A et B (Lam, McGroarty et al. 1989). Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle

respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un mutant isogénique possédant un phénotype rugueux (Cryz, Furer et al. 1983). De plus, les souches "rugueuses" de *P. aeruginosa* sont lysées par le sérum humain, alors que les souches possédant un LPS lisse sont résistantes au sérum (Dasgupta, de Kievit et al. 1994). La variabilité des chaînes polysaccharidiques des antigènes O est à la base du sérotype de *P. aeruginosa* et, de ce fait, cette immunogénicité en fait des cibles évidentes pour l'immunothérapie. Cependant, l'immunisation active basée sur des vaccins d'antigènes O montre un faible pouvoir protecteur quand plusieurs antigènes O de sérotypes différents sont conjugués (Pier 2003; Lang, Horn et al. 2004).

4.2. Facteurs de virulence sécrétés

Ils interviennent dans la dissémination de la bactérie au niveau des tissus et dans l'atténuation des défenses de l'hôte.

4.2.1. Les lectines solubles

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, deux lectines solubles ont été identifiées, dont l'activité est dépendante du calcium. Elles peuvent être détectées au niveau du cytoplasme ainsi qu'au niveau de la membrane externe de la bactérie.

La lectine PA-IL (galactophilic LecA), protéine de 12,7 kDa, interagit spécifiquement avec le D-galactose (Garber, Guempel et al. 1992; Grishin, Krivozubov et al. 2015). Ainsi, elle fixe un grand nombre de glycoprotéines et de glycosphingolipides. L'expression de PA-IL est régulé directement par le quorum sensing « QS » et sa production dépend de la phase de croissance (Winzer, Falconer et al. 2000). Le rôle de cette lectine durant le processus infectieux serait multiple. Elle pourrait faciliter la formation d'agrégats ou de colonies bactériennes par l'intermédiaire des dérivés de galactose présents sur les LPS (Sadovskaya, Brisson et al. 1998), protégeant ainsi les bactéries des défenses immunitaires. De la même manière, elle serait impliquée dans la formation et la stabilisation du biofilm (Diggle, Stacey et al. 2006). PA-IL intervient également dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales ou à la fibronectine. Elle est capable de modifier la perméabilité des cellules intestinales de souris aux exoproduits toxiques (Laughlin, Musch et al. 2000). Elle est également directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires (Bajolet-Laudinat, Girod-de Bentzmann et al. 1994).

La production de la seconde molécule de type lectine (PA-III) est également sous le contrôle du QS (Winzer, Falconer et al. 2000). *In vitro*, elle inhibe le battement ciliaire des cellules

pulmonaires (Adam, Mitchell et al. 1997) et participe également à la formation du biofilm (Tielker, Hacker et al. 2005). En s'associant aux glycoconjugués présents à la surface de la bactérie, elle participerait aux interactions bactérie-hôte ou bactérie-bactérie (Tielker, Hacker et al. 2005).

4.2.2. Exotoxine A (ETA)

C'est la protéine la plus cytotoxique produite par *P. aeruginosa* avec une DL50 de 0,2 mg chez la souris jouant un rôle majeur dans la virulence de la bactérie (Iglewski and Sadoff 1979). Comme la toxine diphtérique, l'ETA est composée de deux domaines de type AB contenant un domaine A catalytique et un domaine B interagissant spécifiquement avec la cellule hôte. Sécrétée sous forme de pro-toxine inactive dans l'espace intercellulaire via le système de sécrétion de type II, sa liaison au LRP (LDL related protein) induit son clivage et l'internalisation de la partie active dont la cible est le facteur d'élongation E2, perturbant ainsi la synthèse protéique et entraînant la mort cellulaire par nécrose (Wick, Frank et al. 1990). Elle diminue également la réponse de l'hôte (Schultz, Rijneveld et al. 2001). Un mutant déficient en ExoA est 20 fois moins virulent chez la souris que la souche sauvage (Miyazaki, Matsumoto et al. 1995).

4.2.3. Les élastases

L'activité élastase de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, *LasA* et *LasB*. L'élastase *LasA* (également nommée protéase staphylolytique ou staphylolysine) est une protéase à sérine qui agit en synergie avec *LasB* augmentant ainsi le pouvoir de dégradation. *LasA* coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme *LasB*. L'élastase (également nommée protéase *LasB* ou pseudolysine) est une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante (Galloway 1991). Cette protéase dégrade l'élastine mais elle est également capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA et les IgG, (Heck, Alarcon et al. 1990), des composants du complément, (Hong and Ghebrehwet 1992), des constituants majeurs de la matrice de l'épithélium pulmonaire comme l'élastine, le collagène et la fibrine. *LasB* s'attaque aussi aux cytokines comme l'interféron gamma et au facteur nécrosant des tumeurs (TNF) (Park, Biedermann et al. 1996).

4.2.4. Les phospholipases C

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80 kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique (Zuckert, Marquis et al. 1998). Trois phospholipases C (PLC) de spécificité de substrat différente ont été identifiées chez *P.*

aeruginosa. Les phospholipases C participent à l'inflammation s'en attaquant aux phosphatidylcholines. Par ailleurs, certaines présentent une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et jouent un rôle dans la mobilité de type « twitching ». Elles sont capables de supprimer la réponse oxydative des neutrophiles (Stonehouse, Cota-Gomez et al. 2002)

4.2.5. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles qui possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes (Liu 1974; Hauser, Cobb et al. 2002). Les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain (Read, Roberts et al. 1985). De plus, ils inhibent la phagocytose (McClure and Schiller 1996). Ils contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa* (Li, Petrova et al. 2014). Comme le flagelle et les pili de type IV, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type "swarming" et la formation de biofilms (Davey, Caiazza et al. 2003), notamment dans l'évolution des microcolonies et le détachement des bactéries du biofilm (Boles, Thoendel et al. 2005).

4.2.6. La pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Lau, Ran et al. 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles (Allen, Dockrell et al. 2005) et induit la production d'IL 8. Son importance dans la virulence de *P. aeruginosa* a été démontrée lors d'infections sur modèle animal (Lau, Ran et al. 2004). Ses propriétés oxydoréductrices lui permettent d'oxyder la glutathione, d'inactiver la catalase des cellules épithéliales bronchiques et ainsi de participer aux lésions liées au stress oxydatif. Récemment, il a été démontré que la pyocyanine inactive l'ATPase vacuolaire et le transport mitochondrial, ce qui a pour conséquence une détérioration des canaux chlorures au cours de la mucoviscidose (Lau, Hassett et al. 2004).

4.2.7. La pyoverdine

La pyoverdine est un sidérophore jouant également un rôle important dans la virulence de *P. aeruginosa* (Takase, Nitani et al. 2000), notamment par régulation de l'expression d'autres facteurs de virulence comme l'exotoxine A (Lamont, Beare et al. 2002).

4.2.8. Les toxines sécrétées *via* le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III induit la nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Par ailleurs, il provoque une déstructuration du cytosquelette des cellules épithéliales. Il joue donc un rôle primordial dans la phase de colonisation et probablement dans la progression de l'infection pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose (Dacheux, Attree et al. 1999; Corech, Rao et al. 2005). Le système de sécrétion de type III existerait, selon les souches, sous deux états, inductible ou non inductible (Dacheux, Goure et al. 2001; Feltman, Schulert et al. 2001; Jain, Ramirez et al. 2004). Plusieurs toxines sont maintenant connues pour être sécrétées *via* le système III:

ExoY, ExoS, exoT et exoU. Toutes les souches de *P. aeruginosa* n'expriment pas l'ensemble de ces toxines (Feltman, Schulert et al. 2001). Il semble notamment que les gènes *exoS* et *exoU* soient rarement retrouvés chez une même souche.

- ExoS et exoT sont des cytotoxines présentant 76% d'homologie de séquence et comprenant deux domaines actifs : une ADP-ribosyltransférase en C-terminal et un domaine activateur de la Rho GTPase (GAP, GTPase activating protein) en N terminal.

Les protéines Rho étant impliquées dans le maintien du cytosquelette d'actine, ces toxines engendrent un dérèglement de son organisation. La partie C terminale est quant à elle impliquée dans l'inhibition de l'internalisation de *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales et les macrophages (Barbieri 2000; Shaver and Hauser 2004).

- ExoY est une adénylate cyclase directement injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Via l'intervention de cofacteurs eucaryotes, elle augmente le niveau d'AMPc intracellulaire et conduit à la formation de pores membranaires et à la détérioration des cellules endothéliales pulmonaires (Sayner, Frank et al. 2004). En perturbant le cytosquelette d'actine, elle interviendrait en début d'infection en modifiant l'invasion des cellules épithéliales par *P. aeruginosa* (Cowell, Evans et al. 2005).

- ExoU possède une activité phospholipase/lysophospholipase de type PLA2 (Sato, Feix et al. 2005), dégradant la membrane cellulaire une fois injectée dans le cytoplasme et activée par des cofacteurs eucaryotes. ExoU possède une cytotoxicité 100 fois supérieure à celle d'exoS (Lee, Smith et al. 2005) et est associé à une forte pathogénicité sur modèle animal (Hauser, Cobb et al. 2002).

Ces facteurs de virulence extracellulaires ou sécrétés, se sont également avérés nécessaires pour l'expression de la virulence de *P. aeruginosa* dans des modèles animaux (Blackwood, Stone et al. 1983; Hauser, Kang et al. 1998).

4.3. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

La synthèse et la sécrétion de la plupart des facteurs de virulence décrits sont modulées en fonction du stade de croissance de la bactérie (phase exponentielle ou stationnaire), du mode de développement (planctonique ou biofilm) et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la bactérie, facteurs étroitement liés. Les systèmes senseurs permettant à *P. aeruginosa* d'adapter son expression protéique aux changements d'état et d'environnement sont principalement les systèmes à deux composants, dont le Quorum Sensing (QS) (Davey and O'Toole G 2000).

Les systèmes de régulation à deux composants permettent, grâce à la détection et la transduction de signaux extérieurs, une réponse rapide de la bactérie face à des modifications de l'environnement. Ils sont classiquement constitués de deux protéines liées par un transfert de phosphate pour la transduction du signal:

- une protéine kinase, généralement située dans une des membranes, appelée senseur. En réponse à un signal, cette protéine s'autophosphoryle.
- un régulateur de réponse sur lequel est transféré le groupement phosphate à partir du senseur. Il possède un domaine de fixation à l'ADN et régule la transcription.

P. aeruginosa possède de nombreux systèmes de régulation à deux composants. Parmi ceux-ci le QS permet une adaptation à l'environnement (stress nutritionnel, ...) particulière (Formation de biofilm) et l'expression coordonnée de nombreux facteurs de virulence en fonction notamment de la densité cellulaire (Davey and O'Toole G 2000) .

5. *Pseudomonas aeruginosa* et Biofilm

La capacité des microorganismes à coloniser les surfaces biotiques et abiotiques est un processus universel. Ce processus conduit à la formation de dépôts plus ou moins structurés, regroupés sous le terme générique de « **biofilm** ». Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, ou du moins peu favorable à une croissance sous forme planctonique. Cette « différenciation » bactérienne conduit à des modifications drastiques du comportement cellulaire, avec modification des fonctions métaboliques et de l'expression des facteurs de virulence, ainsi qu'une sensibilité

diminuée aux moyens de défense naturels ou non de l'hôte, conférant ainsi aux bactéries de nombreux avantages (Davey and O'Toole G 2000):

- protection vis-à-vis des conditions environnementales grâce à la matrice d'exopolymères qui structure le biofilm, assurant une homéostasie du milieu,
- nutrition et coopération métabolique : des canaux aqueux sont présents dans toute la structure du biofilm, permettant l'échange de nutriments et de métabolites entre les espèces du biofilm et avec l'extérieur,
- échange de matériel génétique : la proximité des cellules favorise ces échanges, tendant vers une stabilisation de la structure du biofilm.

Dans le cadre des infections opportunistes, et notamment pour *P. aeruginosa*, l'adhésion et secondairement la colonisation constituent des étapes clés précédant l'infection (Davey and O'Toole G 2000).

5.1. Les étapes de la formation du biofilm de *P.aeruginosa*

Ces dernières années, la modélisation de l'infection par biofilm *in vitro* a conduit à l'identification des déterminants microbiens qui régissent le développement du biofilm. Le mécanisme de la formation du biofilm de *P. aeruginosa* peut être décrit comme un processus dynamique impliquant 5 stades successifs (Sauer, Camper et al. 2002; Renner and Weibel 2011; Kim, Park et al. 2012). Le développement du biofilm est initié par l'attachement réversible de cellules planctoniques à une surface. La seconde étape est une adhésion irréversible des souches dans les heures suivantes et ensuite la multiplication des bactéries. Les bactéries commencent à s'entourer d'une matrice polymérique qu'elles produisent et forment des microcolonies. Par une production supplémentaire de substances polymériques, par motilité cellulaire et par différenciation phénotypique, les bactéries élaborent un biofilm mature, épais et structuré. Une phase suit où des régions du biofilm se dissolvent et les cellules libérées se dispersent pouvant ainsi coloniser de nouvelles surfaces. Actuellement nous manquons cependant d'informations pour savoir si les mécanismes de formation de biofilm identifiés *in vitro* sont pertinents pour le développement *in vivo* (Joo and Otto 2012).

- **Adhésion réversible**

L'étape initiale de la formation du biofilm est une adhésion réversible des bactéries planctoniques à une surface naturelle (minérale, végétale, animale) ou artificielle en réponse à des signaux environnementaux ou nutritionnels (Barraud, Moscoso et al. 2014). A ce stade, *P. aeruginosa* est transitoirement fixé au substrat et est capable de se détacher librement (Sauer,

Camper et al. 2002). Les bactéries planctoniques s'approchent des surfaces par l'intervention de la mobilité bactérienne ou sous l'influence des forces physiques comme les forces d'attraction de van der Waals, les charges électrostatiques de surfaces et des interactions hydrophobes (Donlan 2002). Le flagelle de *P. aeruginosa* s'avère très important dans l'étape de l'approche au support (O'Toole and Kolter 1998). Il confère à la bactérie la capacité de se déplacer selon une mobilité de type swimming et swarming (Kohler, Curty et al. 2000). L'adhésion initiale des bactéries à la surface fait également intervenir des adhésines dont les facteurs d'attachement de type fimbriae. Cependant, les étapes initiales de la formation d'un biofilm in vivo ne sont pas encore claires. Les biofilms peuvent facilement se former sans attachement initial à une surface solide et de nombreuses infections chroniques se développent en absence d'une surface (Bjarnsholt, Hoiby et al. 2012).

- **Adhésion irréversible**

Après une adhésion transitoire des bactéries, l'intervention des pili de type IV permet une adhésion permanente avec la surface ou avec d'autres microorganismes. Les pili de type IV sont des structures fibrillaires présentes chez certaines bactéries à Gram négatif dont le *P. aeruginosa* et sont impliqués dans un type particulier de mobilité associée à la surface, la mobilité de type twitching, caractérisée par l'extension et la rétraction du pilus. Cette fonction permet aux pili de type IV l'approche et la colonisation de la surface (O'Toole and Kolter 1998). Ainsi différents organites extracellulaires, le flagelle, les pili de type IV et les fimbriae, sont essentiels à la formation du biofilm et ce, plus particulièrement dans sa phase initiale. L'attachement des bactéries déclenche la régulation génétique à induire la formation du biofilm et est caractérisé par l'expression des substrats extracellulaires polymériques (SEP) (Renner and Weibel 2011).

- **Maturation primaire**

Après l'étape de colonisation de la surface, on observe une prolifération des bactéries qui donne lieu à la formation des micro-colonies. La formation des micro-colonies est un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité bactérienne obtenue par les pili de type IV. Les bactéries secrètent une matrice d'exopolymères dans laquelle elles s'encapsulent et qui forme une barrière physique entre la communauté et l'environnement extracellulaire (Renner and Weibel 2011).

- **Maturation secondaire**

Les microcolonies se différencient et permettent la maturation du biofilm par les cellules qui se répliquent et les SEP qui s'accumulent. Ainsi les bactéries se multiplient imbibées dans une matrice d'exopolysaccharides. Ce stade implique l'intervention du QS (production de rhamnolipides), la production d'exopolysaccharides ainsi que la répression de l'expression des différents appendices de mobilité (flagelle et pili de type IV). Les bactéries émettent des signaux moléculaires propres au QS. Lorsque la concentration de ces signaux atteint une valeur seuil, la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans la production de rhamnolipides et d'exopolysaccharides est activée. La synthèse des exopolysaccharides est indispensable au « cimentage » de l'adhésion des bactéries aux surfaces et aux autres cellules bactériennes dans le biofilm en développement (facteurs d'adhésion). Les souches de *P. aeruginosa* déficientes en un système de QS fonctionnel sont moins virulentes que les souches sauvages et forment des biofilms plats, moins stables et indifférenciés (Davies, Parsek et al. 1998). Bien que le QS coordonne la différenciation et la maturation des biofilms in vitro, un type sauvage de *P. aeruginosa* déficient en système de QS a formé des biofilms similaires in vivo (Schaber, Triffo et al. 2007).

Le rôle de la migration cellulaire dans la formation des biofilms a notamment été étudié par *Parsek et ses collègues*. Ils constatent qu'une population bactérienne à grande mobilité de surface forme un biofilm plat, horizontal et homogène, tandis qu'une population ayant rapidement cessé de migrer forme un biofilm caractérisé par des agrégats. En réalité, après l'attachement des bactéries à la surface, la communauté bactérienne se divise en deux sous-populations: l'une non mobile et l'autre mobile, via son flagelle et ses pili de type IV. Les premières micro-colonies sont formées par des cellules non mobiles qui prolifèrent à des positions fixes et forment la base du biofilm. La sous-population mobile migre alors, à l'aide des flagelles et pili de type IV, et colonise la base du biofilm pour former la périphérie de la structure (Parsek and Tolker-Nielsen 2008).

Lors de la maturation secondaire, les biofilms atteignent leur épaisseur maximale. L'architecture du biofilm est variable et peut correspondre à un biofilm plat (une couche homogène de cellules) ou à un biofilm hautement organisé avec une structure en champignon contenant des canaux qui semblent essentiels pour fournir des nutriments aux cellules dans les couches profondes du biofilm (Wimpenny, Manz et al. 2000). Cette structure indique qu'en plus des facteurs d'adhésion (composants de la matrice qui interviennent dans l'agrégation), la

maturation du biofilm requiert des facteurs perturbateurs (par exemple, les rhamnolipides) (Joo and Otto 2012).

La structure tridimensionnelle du biofilm est influencée par des conditions physiques, comme la vitesse du flux du milieu dans lequel le biofilm se développe, et des facteurs biologiques (sources nutritives, mobilité bactérienne, surfactants) (Karatan and Watnick 2009). Dans le but de trouver une nouvelle source de nutriments, les microcolonies s'organisent en rangs horizontaux et forment des biofilms minces. La source en carbone du milieu influence également l'architecture du biofilm. La souche ATCC PAO1 développe un biofilm plat et compact lorsqu'elle est en présence de citrate et de casaminoacides comme source de carbone, alors qu'elle forme un biofilm irrégulier avec une structure en champignon lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone (Klausen, Heydorn et al. 2003).

- **Détachement**

Après 9 à 12 jours de formation du biofilm, une phase de dispersion des bactéries à l'état planctonique est possible en réponse à des perturbations externes comme des forces de frottement provenant de l'écoulement d'un fluide (Choi and Morgenroth 2003). Cette étape implique la dispersion de cellules individuelles de la matrice du biofilm et le détachement du film par érosion (Kim, Yoon et al. 2012). Cependant *Sauer et ses collègues* suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un processus actif pour lequel le biofilm est programmé, permettant la colonisation de nouvelles niches par les bactéries libérées. Les bactéries au sein des microcolonies s'éloignent en effet activement de la partie intérieure des amas cellulaires (Sauer, Camper et al. 2002). A côté du processus d'une dispersion passive du biofilm par des paramètres hydrodynamiques (force de frottement), une dispersion active du biofilm existe impliquant un réseau complexe de signaux et régulateurs qui induisent l'activation concertée de la mobilité (pili de type IV et rhamnolipides) et de la dégradation de la matrice. Le processus actif permet aux bactéries qui n'ont plus accès aux nutriments ou souffrent d'une accumulation de déchets d'échapper au micro-environnement devenu défavorable (Karatan and Watnick 2009). Lors du mécanisme de détachement, les bactéries récupèrent leur motilité, produisent des surfactants (Boles, Thoendel et al. 2005) et sécrètent des protéases qui digèrent la matrice du biofilm, libérant les bactéries qui peuvent initier la formation de nouvelles colonies à de nouvelles localisations (Karatan and Watnick 2009; Monds and O'Toole 2009). Ces bactéries individualisées dans le milieu externe sont facilement phagocytées par les

cellules inflammatoires qui entourent la microcolonie et sont sensibles aux antibiotiques, tandis qu'elles sont protégées dans le biofilm (Boles, Thoendel et al. 2005).

5.2. La résistance de *P.aeruginosa* au sein de Biofilm

Le biofilm confère aux bactéries un environnement micro-protecteur les protégeant des antibiotiques et des mécanismes de défense de l'hôte.

La résistance conférée par le biofilm est multifactorielle. Différents mécanismes contribuent à la résistance du biofilm envers les agents antimicrobiens (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010).

La production d'une matrice d'exopolysaccharides, lors du développement des micro-colonies, a souvent été considérée comme une barrière physique difficile à franchir limitant la pénétration de certains agents antimicrobiens à travers la structure du biofilm et donc le contact des bactéries avec les agents antimicrobiens (Costerton 2001). Les polymères extracellulaires diminuent la vitesse de transport de la molécule vers la bactérie ou interagissent avec l'agent antimicrobien et inhibent son action. Cependant malgré que l'échec de certains antibiotiques à pénétrer dans le biofilm ait souvent été avancé comme une explication pour la résistance des biofilms à la thérapie antimicrobienne (Drenkard 2003), (Donlan and Costerton 2002), des mesures directes de pénétration des antibiotiques (daptomycine et nisine) ne supportent pas cette hypothèse (Mah, Pitts et al. 2003).

Costerton et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de niches au niveau du biofilm où les bactéries existent à l'état dormant et protégé (Costerton 1999). Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par un réseau de canaux permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments à l'intérieur du biofilm et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Ainsi un gradient en nutriments et en oxygène se développe du sommet à la base du biofilm et affecte la vitesse de croissance et l'activité métabolique des bactéries. L'accessibilité restreinte aux substances nutritives et à l'oxygène des bactéries se trouvant à la base du biofilm forme ainsi une sous-population métaboliquement non active et non multiplicative. Comme la plupart des antibiotiques ciblent principalement des cellules métaboliquement actives, il a été suggéré que l'hétérogénéité métabolique des bactéries dans le biofilm mène à des différences de susceptibilité aux agents antimicrobiens (Aaron, Ferris et al. 2002; Parsek and Tolker-Nielsen 2008). De plus, les bactéries au centre du biofilm entrent dans une phase stationnaire-dormante (avec une croissance ralentie ou une absence de croissance). Les bactéries avec un taux de croissance ralenti diminuent également la

Synthèse bibliographique

susceptibilité du biofilm aux agents antimicrobiens. Des taux de croissance très faibles de biofilm de *P. aeruginosa* ont en effet été mesurés dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Costerton 1999). Les cellules persistantes représentent une petite sous-population de cellules qui entrent spontanément dans un état-dormant et ne se divisent pas. Ces bactéries persistantes sont très tolérantes aux antibiotiques : même lorsque les biofilms sont traités pendant des temps prolongés ou avec des concentrations élevées en agent antimicrobien, une petite fraction de population persiste (Lewis 2012; Mulcahy, Isabella et al. 2014). Des souches de *P. aeruginosa* persistantes ont été sélectionnées chez des patients atteints de mucoviscidose et suggèrent qu'un lien existe entre ces cellules et les infections récalcitrantes chez ces patients (Mulcahy, Burns et al. 2010).

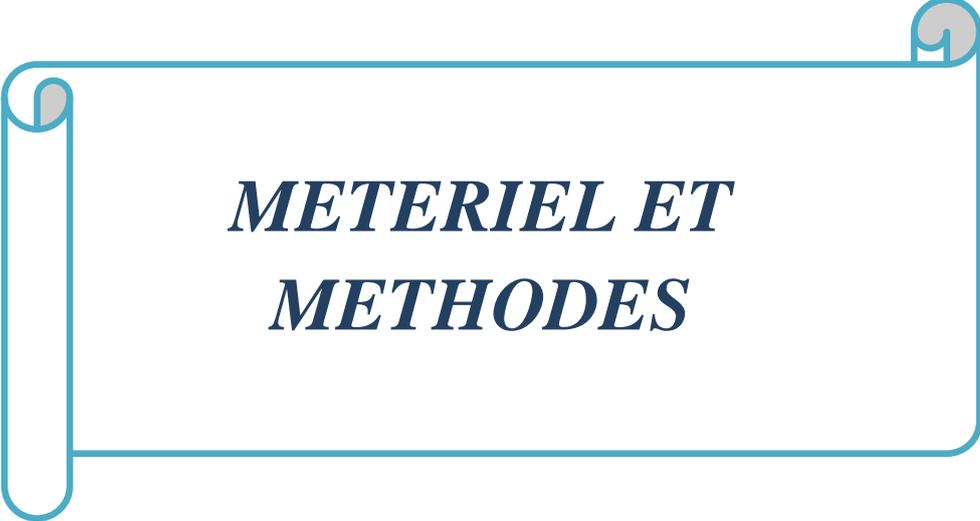
Les conditions environnementales fournies par le biofilm induisent également l'apparition de variants phénotypiques contribuant à la résistance des bactéries envers les agents thérapeutiques. Dès les premiers stades de l'adhésion des bactéries à un support, celles-ci sont soumises à des modifications de l'expression des gènes (Costerton, Stewart et al. 1999). *Sauer et ses collègues* observent chez *P. aeruginosa* une modification de l'expression de nombreuses protéines lors du passage de la bactérie de l'état planctonique à celui du biofilm (Sauer, Camper et al. 2002). Certains gènes nouvellement activés sont responsables d'une modification du profil des protéines composant la membrane externe (Tenke, Koves et al. 2012). *Hancock et Speert* observent chez *P. aeruginosa* une résistance intrinsèque résultant d'une perméabilité restreinte de la membrane externe (Hancock and Speert 2000). La proximité des bactéries dans la structure leur permet le transfert d'informations génétiques (transfert horizontal de gènes) au sein du biofilm à des fréquences très élevées avec pour conséquence un taux de mutation plus important que chez les bactéries isogéniques en mode planctonique, on parle de phénotype hypermutable (Molin and Tolker-Nielsen 2003; Driffield, Miller et al. 2008).

L'augmentation de stress oxydatif dans les biofilms, provoquée par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de facteurs de défense antioxydants est une cause d'augmentation de la mutabilité dans les biofilms. Le stress oxydatif endogène dans les biofilms favorise la résistance aux agents antimicrobiens (Boles and Singh 2008; Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010). Des souches hypermutantes ont en effet été observées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose et colonisés par *P. aeruginosa*, et un lien entre le taux élevé de mutations et l'évolution vers la résistance aux agents antimicrobiens a été

Synthèse bibliographique

proposé (Oliver and Silo-Suh 2013). Les bactéries dans le biofilm peuvent ainsi induire simultanément des modifications au niveau de la régulation de la mobilité, produire des enzymes contribuant à dégrader les antibiotiques, et sur-exprimer des pompes à efflux (Hoiby, Ciofu et al. 2011). L'augmentation de la production de β -lactamases dans les souches cliniques de *P. aeruginosa* est un mécanisme majeur de résistance aux antibiotiques β -lactames (Giwerzman, Jensen et al. 1991).

L'augmentation de la densité cellulaire dans la formation des biofilms active le système du QS. Il a été démontré que le QS détermine la tolérance des biofilms de *P. aeruginosa* à la thérapie antibiotique (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010). Les bactéries du biofilm dans lequel le QS est bloqué, soit par mutation ou par l'administration de médicaments inhibiteurs de QS, sont sensibles au traitement par la tobramycine et l' H_2O_2 contrairement aux bactéries avec un système de QS fonctionnel (Bjarnsholt, Jensen et al. 2005).



***MATERIEL ET
METHODES***

1. Lieu d'étude

Ce travail représente une étude prospective, portant sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine nosocomiale isolées de patients hospitalisés dans les centres hospitaliers universitaires (CHU) d'Annaba-Algérie.

Ces établissements hospitaliers à vocation régionale rayonnent sur un bassin de population de 4 millions d'habitants qui s'étendent sur cinq wilayas, à savoir Annaba, Guelma, Souk Ahras, Tébessa, et El Taref. Les CHU d'Annaba regroupent 39 services, et présentent une capacité de 1072 lits répartis comme suit: l'Hôpital Dorban (189 lits) où sont localisés les services de pneumologie, d'infectiologie, d'hématologie et le service d'ORL ; l'Hôpital Ibn Rochd (450 lits) qui regroupe les services d'urologie, de réanimation chirurgicale, de chirurgie générale et la traumatologie ; l'Hôpital Ibn Sina (243 lits) qui regroupe des services d'endocrinologie, de néphrologie, de réanimation médicale, de cardiologie et des brûlés.

2. Souches bactériennes étudiées

110 souches non répétitives de *Pseudomonas aeruginosa* issues de prélèvements cliniques à visée diagnostique de patients hospitalisés dans différents services des CHU de la ville d'Annaba ont été recueillies au cours de deux périodes :

La première qui va de Janvier 2012 à décembre 2013, cette période a permis d'isoler 80 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

La seconde période allant d'Avril 2014 à Janvier 2015, pendant cette période on a pu isoler 30 souches de *Pseudomonas aeruginosa* qui ont été inclus dans cette étude à partir de service des grands brûlés au niveau du CHU Ibn Sina, Annaba.

Les prélèvements provenant de divers produits pathologiques (urine, sang, pus et sécrétions respiratoires) ont été effectués selon la technique appropriée à chaque prélèvement ; ensuite, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées et identifiées. Ainsi, des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective : type de service où le patient a été admis, type du prélèvement, la date, l'âge et le sexe du patient, l'antibiothérapie et la durée d'hospitalisation. Ces informations sont issues des dossiers de chaque patient à la fin de sa durée d'hospitalisation.

3. Isolement et identification

L'isolement est réalisé sur gélose nutritive supplémentée de 0,02% de cétrimide (Sigma) et incubé 24 heures à 37° C (Crespo et al. 2004). Les colonies présentant une pigmentation verte ou rose sont repiquées sur le même milieu pendant 24 heures à 37° C puis sur Mac Conkey pendant 24 heures à 42° C. L'identification a été réalisée par Galerie API 20NE et test de l'oxydase (Crespo, Woodford et al. 2004).

3.1. Galerie API 20NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est constituée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

4. Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) et les critères de lecture et d'interprétation ont été ceux du European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). <http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012). Des boîtes de gélose Mueller Hinton (BD Difco) sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 0.5 MacFarland diluée à 1/10ème (10^3 bactéries/ml), et les disques d'antibiotiques (bioMérieux) y sont déposés, puis incubées pendant 18 à 24h à 37°C. Douze antibiotiques ont été testés : la Ticarcilline (75 µg), la Pipéracilline (75 µg), la Ticarcilline+l'acide clavulanique (75/10 µg), la Cefotaxime (30 µg), l'Imipénème (10 µg), l'Aztréonam (30 µg), l'Amikacine (30 µg), la Tobramycine (10 µg), la Gentamicine (15 µg), la Ciprofloxacine (5 µg) et la Colistine (50µg).

L'interprétation en Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistant (R) est effectuée selon les critères définis par l'EUCAST, 2012.

5-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

(Petropoulou, Tzanetou et al. 2006).

Les CMI ont été déterminées pour les souches résistantes à l'imipénème et celles productrices de Métallo- β -lactamase en utilisant les bandelettes E-test pour imipénème selon les recommandations de l'EUCAST, 2012.

- **Méthode**

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en $\mu\text{g/ml}$ d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,016 à 256 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,002 à 32 $\mu\text{g/ml}$ selon l'antibiotique (65). L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Mueller Hinton. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose. Un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

6. Détection phénotypique des β -lactamases

6.1. Recherche de la production de BLSE

La recherche de synergie témoignant la présence d'une BLSE a été réalisée par le DDtest (Double Disque synergie test) sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline avec une concentration finale de 500 mg/l. Le test consiste à placer des disques de ceftazidime, céfotaxime, céfépime et d'aztréonam (30 μg) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque de TCC (ticarcilline-clavulanate) (75 μg +10 μg) (Figure 2). L'apparition d'une image de synergie entre le disque de TCC et les disques de ceftazidime, céfotaxime, céfépime, et / ou aztréonam indique la production d'une BLSE (Lee, Park et al. 2005).

6.2. Recherche phénotypique de la production des carbapénèmases

6.2.1. Détection des carbapénèmases par le Carba NP test modifié

Le principe de ce test est que l'hydrolyse des carbapénèmes donnera lieu à un changement de pH de la solution de rouge de phénol, qui se traduira par un changement de couleur du rouge au jaune. (Bakour, Garcia et al. 2015).

- **Réactifs**

- Imipénème (Merck Sharp & Dohme, France) (Poudre pour solution injectable IV).
- Tampon de lyse: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich).
- Rouge de Phénol en poudre (Sigma-Aldrich).
- ZnSO₄, 7 H₂O en poudre (Sigma-Aldrich).

La solution A (solution contenant l'indicateur de pH) est préparée comme suit :

- 1- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume.
- 2- Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml d'eau distillée.
- 3- Ajouter au mélange 180µl d'une solution de ZnSO₄ 10mM.
- 4- Ajuster le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suit :

- 1- Dans un tube Eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse (CTAB 0.02 %).
- 2- Suspendre une dose calibrée (10µl) de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1 à 2 min.
- 3- Transférer 100µl dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B".
- 4- Ajouter 100µl de Solution A dans le tube Eppendorf "A" et 100µl de la Solution A+imipénème 6mg/ml dans le tube Eppendorf "B".
- 5- Vortexer 5 sec puis incubé à 37°C pendant au maximum de 2h.

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube Eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.

| Tube A | Tube B | Interprétation |
|--------|---------------|------------------------------------|
| Rouge | Rouge | Pas de production de Carbapénémase |
| Rouge | Orange/ Jaune | Production de Carbapénémase |
| Jaune | Jaune | Résultat non interprétable |

6.2.2. Test de Hodge

Les souches de *P.aeruginosa* à tester sont ensemencées sous forme de stries déposées à partir du centre jusqu'à la périphérie de la boîte contenant la gélose Mac Conkey, préalablement ensemencée avec une souche *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques). Après 15min, un disque d'imipénème est appliqué au centre et la boîte est incubée à 37°C pendant 18 à 20 heures.

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la présence d'une carbapénémase. (Lee, Lim et al. 2003).

6.2.3. Détection de MBL par bandelette E-test

Les bandelettes E-test® MBL (AB BioMerieux, France) se composent de gradients IMP (4-256 g/ml) et IMP (1-64 g/ml) plus un niveau constant d'EDTA (IMP-EDTA). Le test est effectué en utilisant une procédure E-test standard, en déposant la bandelette sur une gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée par la souche à tester. Après incubation 18 à 24 heures à 37°C, la production de MBL est indiquée par une réduction de la CMI de l'imipénème en présence d'EDTA (rapport CMI de IMP / IMP+EDTA \geq 8) ou l'apparition d'une zone de synergie entre les sections IMP / IMP+EDTA. (Petropoulou, Tzanetou et al. 2006).

6.2.4. Détection des metallo- β -lactamases (M β L) : Test à l'EDTA

La recherche de M β L a été effectuée en utilisant une solution stérilisée par autoclavage d'EDTA à 0,5 M pH 8. Un antibiogramme est réalisé selon les recommandations de l'EUCAST. Deux méthodes ont été utilisées :

- **Méthode des disques combinés**

Deux disques d'imipénème (10 μ g) sont déposés suffisamment distant sur la même boîte de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec la souche à tester, l'un comme témoin et sur l'autre un volume de 5 μ l de solution d'EDTA (750 μ g d'EDTA) est ajouté. En outre, 5 μ l de la solution d'EDTA est ajouté sur un disque vierge (témoin négatif) (Figure 4). Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 16 à 18 h d'incubation à 37 °C. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IMP seul d'au moins 6 mm sont considérées comme souches productrices de M β L (Lee, Lim et al. 2003).

- **Méthode EDTA-disque synergie**

Le test de l'EDTA-disque synergie est réalisé en utilisant un disque d'imipénème (10 μ g) et un disque vierge imbibé avec 10 μ l de solution d'EDTA (1500 μ g d'EDTA) distant de 15mm (bord à bord) (Figure 5). Après 16 à 18 h d'incubation à 37 °C, la présence d'une M β L est détectée par la visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA (Jeong, Bae et al. 2006).

7. Recherche moléculaire des gènes de résistance

7.1. Résistance aux β -lactamines

7.1.1. Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition

Pour chaque isolat, l'ADN total a été extrait par ébullition. Les bactéries ont été cultivées pendant une nuit sous agitation à 37 °C dans 10 ml de bouillon LB. Une anse de 1 μ L de la culture bactérienne était mise en suspension dans 100 μ L d'eau ultra-pure dans un tube Eppendorf. Après 10 minutes, à 100°C dans un bain-marie le tube était centrifugé 8 minutes à 19000g. Le surnageant contenant la matrice d'ADN était récupéré puis conservé à - 20°C pour des études ultérieures.

7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) standard

Le principe de « la polymérase Chain Réaction » (PCR) consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible. Les réactions d'amplifications des gènes codant pour la résistance aux β -lactamines, aminosides et quinolones sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques dans un thermocycleur de type Bio-Rad. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés, les séquences obtenues ont été comparées à celles déposées et blastées contre ARG-ANNOT ou NCBI (Gupta, Padmanabhan et al. 2014).

7.2.1. Gènes de résistance aux β -lactamines

Cette technique est utilisée afin de mettre en évidence le type du gène de BLSE responsable de la résistance aux β -lactamines.

Les gènes des bêta-lactamases recherchées sont de type : *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXAL}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR standard est le suivant :

Matériel et Méthodes

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Perkin Elmer Gene) dans un volume réactionnel de 50µL. Le mélange réactionnel dans chaque puits est composé des éléments suivants : 2µL de l'ADN à amplifier; 0,4 µM de chaque amorce (Forward et Reverse); 100 µM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP); 2U de Taq DNA polymérase (Promega, Madison, USA); 2,5 mM de MgCl₂ et 5 µL de tampon 10 X de PCR (Promega, Madison, USA).

Les différentes étapes de la PCR standard sont effectuées selon le programme décrit ci-dessous.

Tableau 02: Les conditions d'amplification utilisées pour la PCR des gènes BLSE recherchées

| Gènes | Dénaturation initiale | Nombre de cycle | Dénaturation cyclique | Hybridation cyclique | Elongation cyclique | Elongation finale |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| <i>bla</i> _{CTX-M-groupe 1} | 94°C; 5 min | 30 | 94°C ; 1min | 60°C; 1min | 72°C ; 1min | 72°C; 7min |
| <i>bla</i> _{CTX-M-groupe 2} | | | | 60°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M-groupe 8} | | | | 60°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M-groupe 9} | | | | 60°C ; 1 min | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M-groupe25} | | | | 60°C ; 40s | | |
| <i>bla</i> _{TEM} | | | | 52°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{SHV} | | | | 60°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{OXA} | | | | 58°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{GES} | | | | 60°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{PER} | | | | 60°C ; 1min | | |
| <i>bla</i> _{VEB} | | | | 60°C ; 1min | | |

Tableau 03 : Les amorces utilisées pour typer les BLSE produites.

| Gènes | Amorces | Sequence nucléotidique (5'→3') | Taille du gène amplifiée | Références |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>bla</i> _{CTX-M groupe1} | CTX-M1(+) | GGTAAAAAATCACTGCGTC | 863pb | (Barguigua, El Otmani et al. 2011) |
| | CTX-M1(-) | TTGGTGACGATTTTAGCCGC | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M groupe 2} | CTX-M2(+) | ATGATGACTCAGAGCATTCG | 865pb | |
| | CTX-M2(-) | TGGGTACGATTTTCGCCGC | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M groupe 8} | CTX-M8 (+) | TCGCGTTAAGCGGATGATGC | 666pb | |
| | CTX-M8(-) | AACCCACGATGTGGGTAGC | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M group9} | CTX-M9(+) | ATGGTGACAAAGAGAGTGCA | 869pb | |
| | CTX-M9(-) | CCCTTCGGCGATGATTCTC | | |
| <i>bla</i> _{CTX-M group25} | CTX-M25(+) | GCACGATGACATTCGGG | 327pb | |
| | CTX-M25(-) | AACCCACGATGTGGGTAGC | | |
| <i>bla</i> _{GES} | ges (+) | ATGCGCTTCATTCACGCAC | 863pb | |

Matériel et Méthodes

| | | | | |
|---------------------------|---------|--------------------------|--------|-----------|
| | ges (-) | CTATTTGTCCGTGCTCAGGA | | al. 2013) |
| <i>bla</i> _{TEM} | a-216 | ATAAAATTCTTGAAGACGAAA | 1079pb | |
| | a-217 | GACAGTTACCAATGCTTAATCA | | |
| <i>bla</i> _{SHV} | Os-5 | CGCCGGGTATTCTTATTTGTTCGC | 795pb | |
| | Os-6 | CGCCGGGTATTCTTATTTGTTCGC | | |
| <i>bla</i> _{OXA} | Oxa-1 | CCAAAGACGTGG | 440pb | |
| | Oxa-2 | GTAAATTCGACCCCAAGTT | | |
| <i>bla</i> _{PER} | per (+) | CCTGACGATCTGGAACCTTT | 716pb | |
| | per(-) | GCAACCTGCGCAAT(GA)ATAGC | | |
| <i>bla</i> _{VEB} | veb (+) | ATTTCCCGATGCAAAGCGT | 542pb | |
| | veb(-) | TTATTCCGGAAGTCCCTGT | | |

7.2.2. Typage des carbapénèmes co-produites

Les gènes de résistance plasmidiques aux carbapénèmes sont recherchés chez les souches de *P.aeruginosa* ayant une sensibilité diminuée vis-à-vis des carbapénèmes : imipénème.

La PCR standard a été utilisée pour l'identification des carbapénèmes plasmidiques de type : *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES} et *bla*_{IMP}. Les amorces que nous avons utilisées pour typer ces gènes responsables de la résistance aux carbapénèmes sont précisées dans le Tableau 04.

Tableau 04: les amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour des carbapénèmes plasmidiques.

| Gènes | Amorces | Séquence nucléotidiques (5'→3') | Taille de l'amplicon | Références | |
|------------------------------|-----------|---------------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| <i>bla</i> _{NDM} | NDM (+) | AATGGAATTGCCAATATTATGC | | (Mendes, Castanheira et al.) | |
| | NDM(-) | CGAAAGTCAGGCTGTGTTGC | | | |
| <i>bla</i> _{KPC} | KPC(+) | ATGTCACTGTATCGCCGTCT | 881pb | | |
| | KPC(-) | TTACTGCCCGTTGACGCCCA | | | |
| <i>bla</i> _{VIM} | VIM(+) | GGTGTTTGGTCGCATATCGCAAC | 601pb | | |
| | VIM(-) | TGTGCTKGAGCAAKTCTYAGACCG | | | |
| <i>bla</i> _{IMP} | IMP(+) | AGCAAGTTATCTGTATTCTT | 713pb | | (Meradji, Barguigua et al. 2016) |
| | IMP(-) | TTTRCTTTCDTTNARYCCTT | | | |
| <i>bla</i> _{GES} | GES(+) | ATGCGCTTCATTCACGCAC | 863pb | | (Poirel, Le Thomas et al. 2000) |
| | GES(-) | CTATTTGTCCGTGCTCAGGA | | | |
| <i>bla</i> _{OXA-48} | OXA-48(+) | TTGGTGGCATCGATTATCGG | 744pb | | (Woodford, Ellington et al. 2006) |
| | OXA-48(-) | GAGCACTTCTTTTGTGATGGC | | | |
| <i>bla</i> _{OXA-51} | OXA-51(+) | TAATGCTTTGATCGGCCTTG | 353 pb | | |
| | OXA-51(-) | TGGATTGCACTTCATCTTGG | | | |

Matériel et Méthodes

| | | | |
|------------------------------|-----------|----------------------|-------|
| <i>bla</i> _{OXA-23} | OXA-23(+) | GATCGGATTGGAGAACCAGA | 501pb |
| | OXA-23(-) | ATTTCTGACCGCATTTCAT | |
| <i>bla</i> _{OXA-58} | OXA-58(+) | AAGTATTGGGGCTTGTGCTG | 599pb |
| | OXA-58(-) | CCCCTCTGCGCTCTACATAC | |

7.2. Résistance aux aminoglycosides

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modificatrices des aminosides ont été amplifiés par PCR standard: les acétyltransférases *aac(3)-Ia* et *aac(6')-Ib*, les nucléotidyltransférases *ant(2'')-I a* et *aadA*, et les phosphotransférases *aph(3')-VI*.

D'autres gènes qui codent pour les 16S ARNr méthyltransférases ont été également amplifiés par PCR standard: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*. Des PCR standards ont été utilisées pour la détection de ces gènes selon le programme décrit précédemment.

Les amorces utilisées pour typer ces gènes sont précisées dans le tableau ci-dessous.

Tableau05 : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux aminoglycosides

| Gènes | Amorces | Séquence nucléotidiques (5'→3') | Taille de l'amplicons | Références |
|------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| <i>aac(3')</i> | <i>aac(3)-Ia-F</i> | GACATAAGCCTGTTCGGTT | 372 | (Noppe-Leclercq, Wallet et al. 1999) |
| | <i>aac(3)-Ia-R</i> | CTCCGAACCTCACGACCGA | | |
| <i>aac(6')Ib</i> | <i>aac(6')-Ib-F</i> | TATGAGTGGCTAAATCGAT | 395 | Noppe-Leclercq et al., 1999 |
| | <i>aac(6')-Ib-R</i> | CCCGCTTTCTCGTAGCA | | |
| <i>aadA</i> | <i>aadA-F</i> | CCCAATTTGTGTAGGGCTTA | 812 | Noppe-Leclercq et al., 1999 |
| | <i>aadA-R</i> | TTGTACGGCTCCGCGAGTG | | |
| <i>ant(2')</i> | <i>ant(2'')-I -F</i> | GACACAACGCAGGTCACATT | 524 | (Kim, Park et al. 2008) |
| | <i>ant(2'')-I -R</i> | CGCATATCGCGACCTGAAAGC | | |
| <i>aph(3')</i> | <i>aph(3')-VIF</i> | CGGAAACAGCGTTTTAGA | 716 | Noppe-Leclercq et al., 1999 |
| | <i>aph(3)-VI-R</i> | TTCCTTTTGTGAGGTC | | |
| <i>armA</i> | <i>armA-F</i> | AGGTTGTTTCCATTTCTGAG | 590 | Kim et al., 2008 |
| | <i>armA-R</i> | TCTCTTCCATTCCCTTCTCC | | |
| <i>armtA</i> | <i>rmtA-F</i> | CTAGCGTCCATCCTTTCCTC | 634 | Hidalgo et al., 2013 |
| | <i>rmtA-R</i> | TTTGCTTCCATGCCCTTGCC | | |
| <i>rmtB</i> | <i>rmtB-F</i> | ATGAACATCAACGATGCCCT | 769 | Hidalgo et al., 2013 |
| | <i>rmtB-R</i> | CCTTCTGATTGGCTTATCCA | | |
| <i>rmtC</i> | <i>rmtC-F</i> | CGAAGAAGTAACAGCCAAAG | 711 | Hidalgo et al., 2013 |
| | <i>rmtC-R</i> | ATCCCAACATCTCTCCACT | | |
| | <i>rmtD-F</i> | CGGCACGCGATTGGGAAGC | | (Hidalgo, Hopkins et al. |

Matériel et Méthodes

| | | | | |
|-------------|--------|-------------------------|-----|----------------------|
| <i>rmtD</i> | rmtD-R | CGGAAACGATGCGACGAT | 401 | 2013) |
| <i>rmtE</i> | rmtE-F | ATGAATATTGATGAAATGGTTGC | 818 | Hidalgo et al., 2013 |
| | rmtE-R | TGATTGATTCCTCCGTTTTTG | | |
| <i>rmtF</i> | rmtF-F | GCGATACAGAAAACCGAAGG | 589 | Hidalgo et al., 2013 |
| | rmtF-R | ACCAGTCGGCATAGTGCTTT | | |

7.3. Recherche de la coexistence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones

- le gène *qnr* (quinolone resistance) codant une protéine de 218 acides aminés entre en compétition avec les quinolones pour l'accessibilité de l'ADN gyrase, et de la topoisomérase IV (Jacoby, Walsh et al. 2006). A ce jour cinq, Qnr ont été mises en évidence, QnrA, QnrB, QnrS, QnrD et QnrC (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>).
- Le gène *aac (6')-Ib-cr* codant un aminoside *N*-acétyltransférase qui inactive les FQ par une acétylation au niveau de l'azote aminé du substituant pipérazinyl (Robicsek, Strahilevitz et al. 2006).
- Le gène *qepA* (quinolone efflux pump) codant une protéine agissant comme une pompe à efflux (Yamane, Wachino et al. 2007).

Le niveau de résistance aux quinolones conféré par ces gènes est faible. Pour cette raison nous avons testé la totalité des souches sans distinction entre bactéries résistantes et sensibles aux quinolones.

7.3.1. Résistance de type *qnr*

Les déterminants de résistance plasmidique aux quinolones sont analysés en amplifiant par PCR multiplexe les gènes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (Tableau06).

Tableau 06 : les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de résistance plasmidiques aux quinolones

| Gènes | Amorces | Séquence nucléotidique (5'→3') | Taille de l'amplicons | Références |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <i>qnrA</i> | qnrA (+) | TTCTCACGCCAGGATTTGAG | 571pb | (Maroui, Barguigua et al. 2016). |
| | qnrA (-) | TGCCAGGCACAGATCTTGAC | | |
| <i>qnrB</i> | qnrB (+) | TGGCGAAAAAATT(GA)ACAGAA | 594pb | |
| | qnrB (-) | GAGCAACGA(TC)GCCTGGTAG | | |
| <i>qnrS</i> | qnrS (+) | GACGTGCTAACTTGCGTGAT | 388pb | |
| | qnrS (-) | AACACCTCGACTTAAGTCTGA | | |
| | <i>aac(6')-Ib (-)</i> | AACCATGTACACGGCTGG | | |

Matériel et Méthodes

La PCR multiplexe est réalisée uniquement pour détecter la présence des gènes codant pour la résistance plasmidique aux quinolones. La composition du mélange réactionnel utilisé dans la PCR est donnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 07 : Composition du mélange réactionnel pour les PCR multiplexe

| Composants | Quantité |
|---------------------------------|----------|
| Quantitect Probe PCR Master Mix | 7.35µl |
| Amorce Forward (0.02nmol/µl) | 0.5 µl |
| Amorce Reverse (0.02nmol/µl) | 0.5µl |
| H2O UTP | 15.65µl |
| ADN à amplifier | 2µl |

Les différentes étapes de la PCR multiplexe comprennent une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 60°C pendant 45 secondes, 72°C pendant une minute, puis une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

7.3.2. Résistance de type *aac (6')-Ib-cr* : PCR-RFLP

L'identification du variant *aac (6')-Ib-cr* à été faite par la technique de PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism), repose sur l'amplification des gènes *aac (6')-Ib* (variant sauvage) dans un premier temps et la digestion enzymatiques des fragments d'ADN générées par la PCR à l'aide de la technique RFLP dans un deuxième temps dans le but à identifier le variant *aac (6')-Ib-cr*.

- **Réaction de la PCR**

La PCR RFLP est réalisée uniquement pour détecter la présence du gène *aac (6')-Ib-cr* codant pour la résistance aux aminosides et aux quinolones. La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 50µL. La composition du mélange réactionnel utilisé dans la PCR est donnée dans le tableau ci-dessous.

Matériel et Méthodes

Tableau 08 : Composition du mélange réactionnel pour les PCR RFLP

| Composants | Quantité |
|---------------------------------|----------|
| Quantitect Probe PCR Master Mix | 7.35µl |
| Amorce Forward (0.02nmol/µl) | 0.5 µl |
| Amorce Reverse (0.02nmol/µl) | 0.5µl |
| H2O UTP | 15.65µl |
| ADN à amplifier | 2µl |

Les conditions d'amplifications utilisées dans cette PCR sont : dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 58°C pendant 1min, 72°C pendant une minute, puis une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

- **La PCR de type RFLP**

L'enzyme de restriction utilisé pour l'identification du variant *aac (6')-Ib-cr* dans notre étude, est l'enzyme *FokI* (BioLabs, New England), qui a un site de reconnaissance présent seulement dans le gène *aac(6')-Ib* type sauvage (**figure 3**) (le variant *aac (6')-Ib-cr* n'a pas ce site de reconnaissance). Les produits de PCR positifs contenant le gène *aac (6')-Ib* sont coupés en deux fragments de taille 224pb et 189pb.



Figure 3: La séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction *FokI*

La réaction de la digestion enzymatique a été faite à 37°C pendant 3 heures dans un volume final de 16µL constitué de : 1U de l'enzyme *FokI* ; 8µL de produit du PCR et l'eau ultra-pure.

7.4. Recherche des Intégrons de classe 1

La PCR standard a été utilisée pour l'identification des cassettes de gènes d'Intégrons de classe 1 et d'en connaître leur taille. Les amorces utilisés pour cette PCR sont spécifiques des zones caractérisant tous les intégrons de classe 1 : CS-5' et CS-3' et génèrent des tailles variables.

La séquence nucléotidique des amorces utilisées :



La composition du mélange réactionnel et le programme utilisé sont décrit précédemment.

8. Analyse des produits de l'amplification

8.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification de toutes les PCR décrites précédemment sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

C'est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer des macromolécules (l'ADN, l'ARN ou les protéines) en fonction de leur taille et leur charge électrique. Pour vérifier la présence et l'amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA). La migration se fait pendant 25 minutes sous un voltage de 135V. Les différentes étapes de préparation sont les suivantes :

- **La préparation du gel d'agarose**

- Dans un Becher, mélanger 6g de poudre d'agarose dans 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Ajouter la solution de Bromure d'Ethidium BET diluée ou le Sybersafe (intercalant d'ADN) (12.5 µl pour 50 ml gel d'agarose).
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange transparent.
- Laisser refroidir.
- Mettre le peigne dans le support du gel et couler le gel.
- Laisser refroidir le gel jusqu'à solidification.

- **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE X0.5 et le gel doit être totalement émergé par ce tampon.
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier et/ou le dernier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du tampon de charge (10X Blue Juice®, Gel Loading Buffer Invitrogen®).

Matériel et Méthodes

- **Révélation**

- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif (Mix sans ADN) et un témoin positif (Mix contenant l'ADN recherché)
- Fermer le couvercle de la cuve et brancher la cuve au générateur.
- Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration à environ 25 min.
- Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le poids moléculaire du gène du témoin positif, si les tailles sont identiques, le résultat est positif. Si les tailles sont très différentes, le résultat peut être rendu négatif. Si les tailles sont proches, le résultat est ininterprétable et peut nécessiter la détermination de la séquence du produit d'amplification.

Les souches de référence utilisées pour contrôler et lire les résultats des PCRs sont précisés dans le tableau09.

Tableau 09 : les souches de références utilisées pour le contrôle des PCRs

| Espèces | Codes de références | Enzymes produites |
|------------------------|---|--------------------------|
| <i>E. coli</i> | U2A1790 | CTX-M-1 |
| <i>E. coli</i> | U2A1799 | CTX-M-9 |
| <i>Salmonella sp</i> | U2A2145 | CTX-M-2 |
| <i>Salmonella sp.</i> | U2A1446 | TEM-1 ; SHV-12 |
| <i>Kluy. georgiana</i> | U2A 2251 | CTX-M groupe 8 (KLUG-1) |
| <i>P. aeruginosa</i> | U2A1125 | PER |
| <i>A. baumannii</i> | U2A2026 | VEB |
| <i>E. coli</i> | U2A1528 | <i>aac(6')-Ib</i> |
| <i>E. coli</i> | U2A2118 | <i>qnrA1</i> |
| <i>E. coli</i> | U2A2119 | <i>qnrB1</i> |
| <i>E. coli</i> | U2A2120 | <i>qnrS1</i> |
| <i>E. coli</i> | TOP 10/pAT791 | <i>qepA</i> |
| <i>K. pneumoniae</i> | U2A 2240 | DHA-1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | U2A 2239 | MOX-2 |
| <i>K. pneumoniae</i> | U2A 2241 | ACC-1 |
| <i>K. oxytoca</i> | U2A 1891 | CIT ; FOX |
| <i>E. cloacae</i> | U2A 2242 | KPC-3 |
| <i>K. pneumoniae</i> | U2A 2252 | GES-1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | U2A 2257 | IMP-1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | U2A 2016 | VIM |
| <i>K. pneumoniae</i> | Benouda et al. (Benouda, Touzani et al. 2010) | OXA-48 |
| <i>K. pneumoniae</i> | Poirel et al. (Poirel, Benouda et al. 2011) | NDM-1 |
| <i>E. coli</i> | U2A2446 | <i>Orf513</i> ; OXA-1 |

9. Séquençage par la méthode de Sanger

La technique de séquençage décrite par Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) permet la synthèse interrompue d'ADN simple brin, à partir d'une amorce hybridée sur la matrice d'ADN à séquencer. Cette synthèse est faite par l'ADN polymérase en présence des quatre 2'-désoxyribonucléoside-5'-triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et des quatre 2',3'-didésoxyribonucléoside-5'-triphosphates (ddATP*, ddCTP*, ddGTP* ou ddTTP*) marqués chacun par un fluorochrome distinct. Le séquençage passe par les étapes suivantes :

9.1. Purification des produits de PCR

Les produits à séquencer sont soumis à une purification enzymatique avant de faire l'objet de séquençage. Cette purification vise à éliminer le reste des amorces, désoxynucléotides et de fragments d'ADN non amplifiés, et ce par deux enzymes : l'exonucléase et la phosphatase alcaline. La réaction de digestion enzymatique a été effectuée dans un volume réactionnel de 7 μ L contenant 4 μ L d'ADN de PCR, 1U d'exonucléase, 1U de phosphatase alcaline et compléter par l'eau ultra-pure.

Cette réaction est faite dans un thermocycleur réglé en deux phases, la première est menée à température de 37°C pendant 20 min et la deuxième à une température de 85°C pendant la même durée.

9.2. Réaction de séquence

Les réactions de séquençage ont été faites sur thermocycleur GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Warrington, UK), en utilisant le kit « Big Dye Terminator v3.1 » (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

- **PCR Big Dye**

Cette PCR consiste à amplifier le forward et le reverse séparément pour les séquencer.

Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant :

Dans une plaque de thermocycleur GenAmp on dépose 20 μ l du mélange réactionnel dans chaque puits composé de buffer, mix BigDye, amorce R ou amorce F, H₂O UP et ADN à amplifier. Pour chaque ADN pure d'une souche bactérienne, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le forward et l'autre pour le reverse, exécuté selon le programme porté dans le tableau ci-dessous. L'amplification pour la PCR Big Dye est programmée en 25 cycles.

Matériel et Méthodes

Tableau 10: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.

| Composants pour Forward | Composants pour Reverse | Quantité PCR BigDye |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| Buffer | Buffer | 3µl |
| MixBigDye | MixBigDye | 2µl |
| Amorce F | Amorce R | 1µl |
| H2O UP | H2O UP | 10µl |
| ADN à amplifier | ADN à amplifier | 4µl |

Tableau 11: Programme de l'amplification de la PCR BigDye.

| Température | 96°C | 96°C | 50°C | 60°C | 4°C |
|-------------|-------|--------|-------|-------|-----|
| Temps | 2 min | 10 sec | 1cmin | 15sec | ∞ |

9.3. Purification des produits de séquençage

Afin d'éliminer les réactifs non incorporés lors de la réaction de séquençage et qui peuvent interférer dans l'électrophorèse, les molécules d'ADN néosynthétisées sont purifiées par la technique de précipitation : éthanol / EDTA. Les produits de réaction de séquence est précipité par 70 µL d'éthanol absolu et 5 µL EDTA (125 mM) pendant 30 min à l'obscurité dans une température ambiante. Ensuite, le culot obtenu après une première centrifugation (3300g ; 30 min) est lavé avec 70 µL d'éthanol à 70%. Après une deuxième centrifugation (3300g ; 15 min) le culot est séché à température ambiante, repris dans 20 µL de solution dénaturante (Formamide). Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

- **Méthode du séquençage**

- Remplir les fiches pour séquençage.
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le support).
- Mettre la plaque dans le séquenceur Automate ABI 3130.
- Lancer le séquençage

- **Analyse des séquences ADN**

- La correction et l'analyse des séquences obtenues ont été faites par le séquenceur Genetic Analyzer 3130X1 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analyse est faite

avec le logiciel *BioEdit* (*Applied biosystems*) qui permet en plus d'aligner le brin reverse avec le brin forward, de définir une séquence d'ADN consensus.

- Comparer les séquences *via* internet avec les séquences homologues retrouvées dans la banque informatique internationale « *BLST* » du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), en utilisant soit le BLSATN (séquence nucléotidique) qui compare les bases azotées de l'ADN ou le BLASTP (séquence protéique) qui compare les acides aminés de la protéine traduite.

- Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de similarité de la souche à étudier avec les espèces les plus proches pour déterminer leur affiliation génétique ou bien par l'utilisation d'un logiciel appelé ARG-ANNOT. (Gupta et al. 2014b).

10. Détermination phénotypique des facteurs de virulence

10.1. Détermination de la cinétique de formation de biofilm

L'étude d'adhésion et de formation de biofilm par *P.aeruginosa* a été effectuée en utilisant des plaques de microtitrage à 96 puits (Nuncon Micro Well polystyrène, Nunc) selon la technique décrite par *O'Toole et ses collaborateurs* :

A partir d'une culture bactérienne de 18h dans un milieu LB additionné du Glucose à 0,4%, les puits d'une plaque 96 puits (PVC) sont inoculés avec 20 μ L d'une suspension de bactéries diluées au 1/10, chaque puits de la plaque contient précédemment 160 μ L de LB additionné du Glucose 0,4%. Après, les plaques de microtitrage sont mises en incubation, des intervalles de temps réguliers de deux heures d'incubation sont choisis (2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 16h, 18h, 20h, 22h, 24h) à 37 ° C, la formation du biofilm adhérent à la surface des microplaques a été mesurée par coloration des cellules fixées pendant 15 min avec 0,5% (p / v) de cristal violet (CV) (Figure 10). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de CV, les puits sont vidés et rincés 3 fois à l'eau. 180 μ L d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés après avoir laissé sécher quelques minutes. La quantité de cristal violet solubilisé après 5 min d'incubation à température ambiante est mesurée par lecture de la DO à 550 nm dans un lecteur de plaque ELISA. Pour chaque isolat le test a été fait en triplé. En tant que témoin, 150 μ L de LB stérile ont été utilisés (O'Toole and Kolter 1998).

Matériel et Méthodes

- **Lecture**

La classification des résultats obtenus est présentée sur la base du DO témoin. La densité optique du témoin (Dot) a été définie comme trois écarts-types au-dessus du DO moyenne du contrôle négatif. Les souches ont été alors classées comme suit

Les isolats non formateurs de biofilm ($DO < DO_t$),

Les faibles formateurs de biofilm ($DO_t < DO < 2X DO_t$),

Les formateurs de biofilm modérés ($DO_{t \times 2} < DO < DO_{t \times 4}$),

Les fortement formateurs de biofilm ($DO_{t \times 4} < DO$).

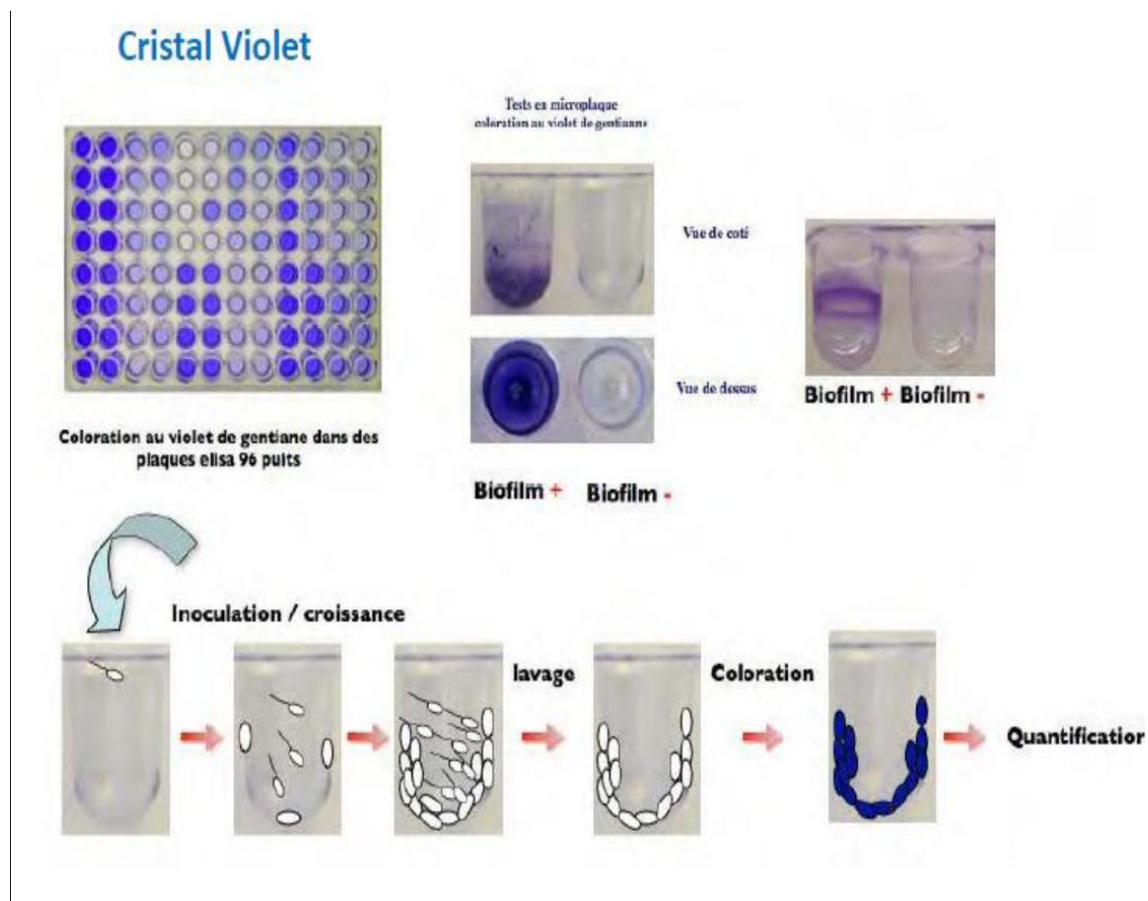


Figure 04 : La technique de Formation de biofilm en microplaque PVC

10.2. Détermination de l'effet des antibiotiques sur la cinétique de formation de biofilm

Nous avons utilisé la même technique précédente, bref, 20 µl d'une culture d'une nuit ont été inoculée dans 160 µl de milieu LB contenant les plaques de microtitrage à 96 puits avec différentes concentrations de l'imipénème allant de 4 µg/ml à 128 µg/ml et de la ciprofloxacine 0.5 µg/ml à 8 µg/ml. Nous avons ensuite étudié l'effet de l'imipénème et la ciprofloxacine sur la capacité de formation du biofilm d'un isolat de chaque clone producteur de MBL (Pa.4 pour le clone A, Pa.12 pour clone B, Pa.10 pour clone C et Pa.27 pour clone D). Tous les essais ont été produits en triplé.

Pour chaque plaque, des puits servant de témoin sont utilisés, trois puits témoin sont utilisés pour le contrôle de la stérilité du milieu (sans produit et sans microorganisme) et trois puits témoin pour le contrôle de la croissance des microorganismes (sans produit et avec microorganisme). La DO initiale après incubation avec différentes concentrations des antibiotiques est comparée à celle du témoin sans antibiotique. (Meradji, Barguigua et al. 2016).

10.3. Recherche de l'activité protéolytique

La capacité des isolats à hydrolyser la caséine a été testée sur un milieu spécifique tryptone caséine soja agar (TCS) (Sanofi Diagnostics Pasteur) contenant 10% (p / v) de lait écrémé (Difco, Barcelone, Espagne) et de la streptomycine à 50 µg /ml.

A partir d'une culture bactérienne de 18h dans un milieu BHI incubé sous agitation, un volume (1 ml) de la suspension est centrifugé à 13 000 g pendant 10 min, 100 µl de chaque suspension pour chaque souche ont été placées dans des puits de 5 mm de diamètre découpés dans de la gélose TCS et mises en incubation à 37 ° C pendant 24 h. Ce test a été réalisé en triple. La présence d'une zone transparente autour des puits a indiqué l'activité de la protéase et le diamètre de la zone transparente reflète l'intensité de l'exoenzyme libérée (Castro-Escarpulli, Figueras et al. 2003).

10.4. Recherche de l'activité hémolytique

L'activité hémolytique a été étudiée pour évaluer la présence de facteurs de virulence associée à une hémolyse. Les souches ont été testées pour leur l'activité hémolytique sur une gélose base (Oxoid France) supplémenté avec 5% de globules rouges de mouton. 5 µl de chaque suspension ont été placée dans des puits découpés dans de la gélose et mises en incubation à 37 ° C pendant 24 heures. Ce test a été réalisé trois fois pour chaque souche. La présence d'une zone incolore limpide entourant les puits découpés dans la gélose a indiqué la présence d'une activité hémolytique (Deziel, Comeau et al. 2001).

10.5. Recherche de la DNase

La recherche de la DNase c'est un test qui a été utilisé pour identifier les bactéries capables de produire une exoenzyme, c'est la désoxyribonucléase. Le milieu de culture utilisé c'est une gélose contenant une émulsion de l'ADN et des peptides comme source d'éléments nutritifs. Les colonies bactériennes qui sécrètent une DNase hydrolysent l'ADN dans le milieu en plus petits fragments; après incubation de 24h à 37°C, les boîte de Pétri sont inondées avec HCl, à 1%, des zones transparentes des fois rosâtres apparaissent autour des colonies indiquant un résultat positif (Finnan, Morrissey et al. 2004).

10.6. Mise en évidence de la motilité

Trois types de motilité ont été recherchés. Ce test a été réalisé trois fois pour chaque isolat. Le degré de la motilité des isolats testés était variable; un diamètre de 1 cm de la motilité a été choisi pour faire la distinction entre les souches très mobiles (> 1 cm) et les souches moins mobiles (<1cm).

- **Test de motilité de type *Swimming***

Des boîte de Pétri contenant le milieu Tryptone Swim agar (1% de tryptone, 0,5% de NaCl et 0,3% d'agar) ont été inoculés avec des bactéries en utilisant un cure-dent stérile et ont été mises en incubation pendant 16 h à 25 ° C. Nous avons évalué qualitativement la motilité en

examinant la zone turbide circulaire formée par des cellules bactériennes qui migrent à distance du point d'inoculation (Deziel, Comeau et al. 2001).

- **Test de motilité de type *Swarming***

Les milieux de culture destinés pour l'étude de ce type de motilité étaient composés de 0,5% de Bacto agar et 8 g de bouillon nutritif / litre (à la fois chez Difco, Detroit, Michigan) supplémenté avec 5 g de glucose / litre, ensuite sont séchés pendant une nuit à la température ambiante. Les cellules ont été inoculées avec le point d'un cure-dent stérile, et les plaques ont été incubées à 30 ° C pendant 24 heures. La motilité a ensuite été évaluée qualitativement en examinant la zone turbide circulaire formée par des cellules bactériennes qui migrent à partir du point d'inoculation.

- **Test de motilité de type *Twitching***

Les colonies de *P. aeruginosa* à tester sont inoculées (environ 3 mm de profondeur) dans une boîte contenant un milieu spécifique gélosé à l'aide d'un cure-dent stérile. Après incubation à 30 ° C pendant 24h la gélose a été soigneusement enlevée et la zone de motilité à l'interface d'agar / boîte de Pétri a été visualisée et mesurée par coloration au cristal violet (Deziel, Comeau et al. 2001).

11. Etude de la relation épidémiologique entre les souches étudiées : électrophorèse en champ pulsé

11.1. Principe

L'électrophorèse en champ pulsé (ECP, ou PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis) a été mise au point dans les années 1980. Cette technique est à présent considérée comme la méthode de typage de référence pour les enquêtes épidémiologiques. (Egly, et al. 1993).

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique discriminante qui permet de distinguer des souches génétiquement très proches et offre une bonne reproductibilité, malgré un délai d'analyse relativement long. Cette méthode a prouvé son efficacité dans de nombreuses enquêtes épidémiologiques et a permis la comparaison de nombreux génotypes dont l'identification aurait été difficile par d'autres méthodes (Tumeo, Gbaguidi-Haore et al. 2008; Vettoretti, Floret et al. 2009).

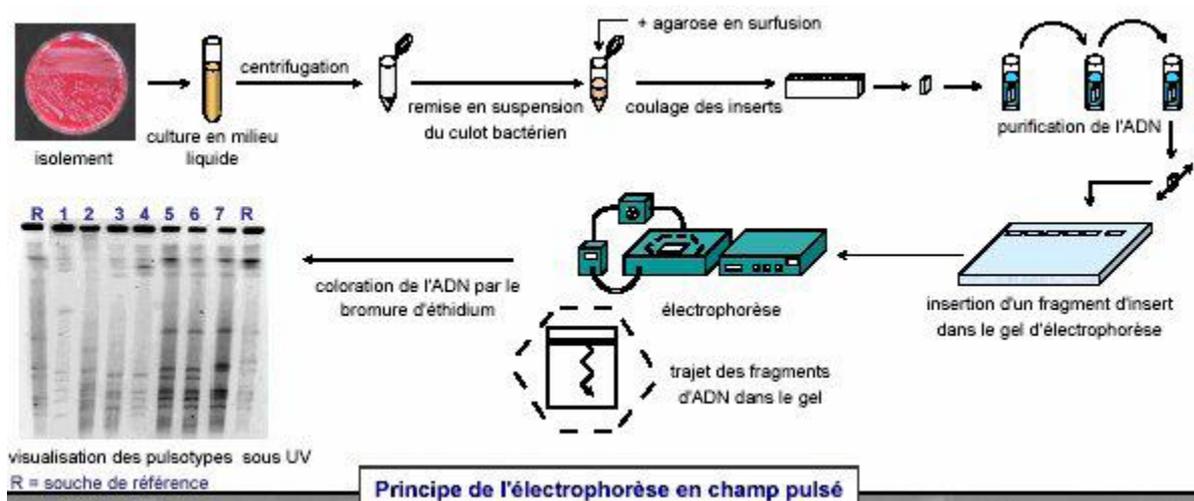


Figure 05 : Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé

11.2. Mode opératoire

La technique de génotypage par l'électrophorèse en champ pulsé se déroule sur une durée de 9 jours. Elle est réalisée selon la méthode développée par *Talon et al* (Talon, Cailleaux et al. 1996).

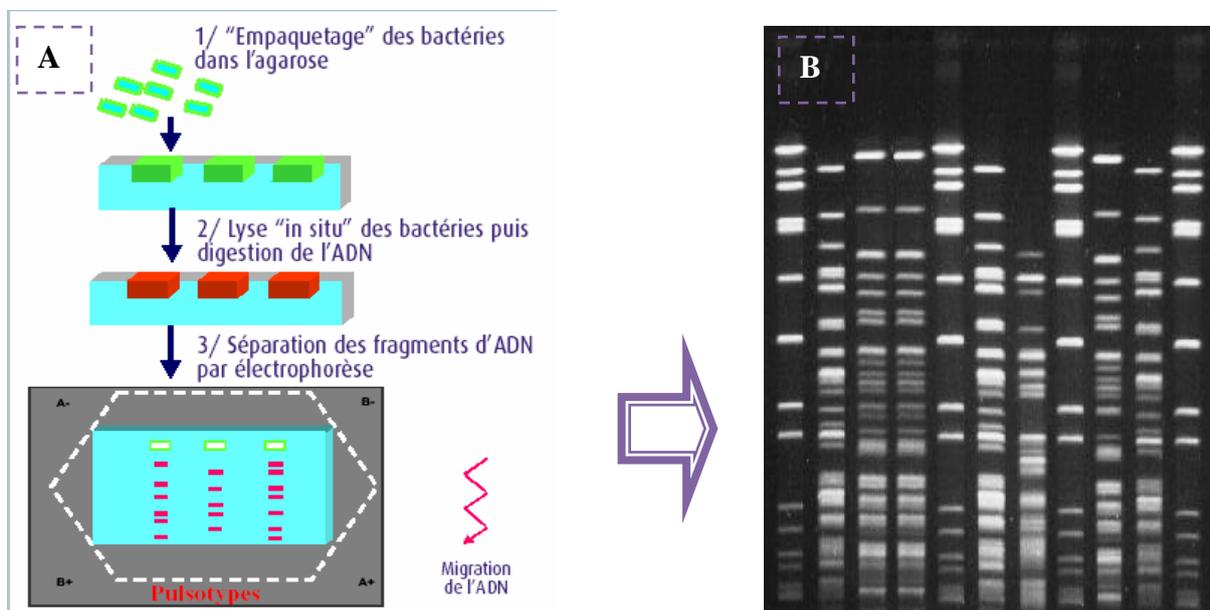


Figure06 : l'électrophorèse en champ pulsé, mode opératoire (A), et photo d'un gel (B).

Matériel et Méthodes

J1 : Préparation de l'ADN total

Les différentes souches de *P.aeruginosa* ont été cultivées sur un milieu MH gélosé pendant 18 heures à 37°C.

J2 : Préparation des blocs (insertion de l'ADN dans une matrice d'agarose)

Une quantité de bactéries a été mise en suspension dans 1 ml de tampon Tris-HCL 10mM, NaCl 1 M, pH 7.6 (PETT 1V) à raison de 10⁹ UFC/ml. Les cellules étaient récupérées par centrifugation à 10000 g puis remises en suspension dans 1 ml de tampon PETT 1V à 42°C.

Cette suspension était mélangée avec un volume égal d'agarose à bas point de fusion (Incert agarose ; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA), à 1% dans le tampon PETT 1V, puis après liquéfaction la solution obtenue était coulée dans des moules Bio-Rad. Les blocs étaient solidifiés dans de la glace puis incubés dans un mélange EDTA 0.5M, N-lauroylsarcosine à 1%, protéinase K à 1mg/ml, pH 8.0 (ESP) pendant 48h à 55°C pour permettre la lyse de la paroi et la déprotéinisation.

J5 : Lavage des blocs

Après la protéolyse, les inserts d'ADN génomique étaient incubés 2 fois à 42°C pendant une heure avec un tampon Tris-acide acétique 10 mM, EDTA 0.1mM, pH7.5 (TE-acétate) contenant du fluorure de phénylméthanesulphonyle 1mM (PMSF) pour inactiver la protéinase K, puis 2 fois une heure à 42°C une nuit, avec le tampon de l'endonucléase approprié, pour éliminer l'EDTA. Les deux autres tiers de chaque bloc d'agarose étaient conservés en tampon TE-acétate à 4°C pour une éventuelle utilisation ultérieure. Parallèlement, pour permettre la comparaison des profils intra-gels et inter-gels, la souche de référence de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Culture) a été préparée et placée dans du tampon adapté à l'enzyme de restriction *SmaI* et placée également à 4°C.

J6 : Restriction enzymatique

Les inserts (1/3) d'ADN génomique ont été incubés avec 40 unités de l'endonucléase appropriée, à la température optimale d'activité de l'enzyme :

DraI (Roche Diagnostics) pour *P.aeruginosa* : 37°C

SmaI (Q-BIOgene) pour *Staphylococcus aureus* : 25°C

J7 : Séparation des fragments d'ADN

Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DRIII, Bio-Rad, Richmond, USA) sous les conditions suivantes : 5.5 V/cm à 14°C, avec des impulsions de 20 secondes pendant 12 heures puis de 5 à 15 secondes pendant 17 heures. La souche de *S.aureus* NCTC 8325 a été incluse dans chaque gel après restriction par *SmaI*.

J8 : Révélation du gel

Les gels d'électrophorèse ont été colorés par une solution de bromure d'ethidium à 0.5µg/ml durant 30 min, puis lavés à l'eau distillée pendant 2 heures, avant d'être révélés par transillumination aux rayons ultraviolets à 312 nm et photographiés avec le système *Visio-Capt* (Labgene).

J9 : Comparaison des profils électrophorétiques et interprétation

Le logiciel GelCompar version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) a été utilisé pour établir la matrice de similitude d'ADN basée sur le calcul du coefficient de corrélation de Dice, qui analyse les profils deux à deux et qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils. Donc le pourcentage de similitude entre deux profils électrophorétiques de deux souches peut être calculé par le coefficient de Dice, selon la formule :

Matériel et Méthodes

$$SD = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Où (a) est le nombre de fragments communs aux deux souches, (b) et (c) le nombre de fragments différents pour chacune des souches. Dans cette formule, l'importance attribuée aux fragments différents dépend du nombre total de fragment obtenus par le marqueur étudié. Après comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice des similitudes peut être alors obtenue permettant de construire une représentation graphique des distances entre les souches sous forme de dendrogramme.

Ensuite, on construit le dendrogramme en utilisant l'algorithme de hiérarchisation UPGMA (unweighted pair group method using mathematical averages).

Les génotypes majeurs ont été définis comme les profils obtenus par ECP différant les uns des autres par plus de 5 fragments, selon les recommandations de *Tenover et al.*

Les souches dont le profil différait jusqu'à 5 fragments, ont été considérées comme des variants à l'intérieur des génotypes majeurs. Quand il n'y avait aucune différence entre les profils, les souches étaient considérées comme identiques. Les génotypes majeurs ont été dénommés par un chiffre (Tableau 12)

Tableau 12 : Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générées par PFGE (d'après *Tenover et al.*).

| Catégorie | Nombre d'évènements génétiques | Nombre de fragments différents | Interprétation épidémiologique |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| Identiques | 0 | 0 | Les isolats font partie de l'épidémie |
| Etroitement liés | 1 | 2-3 | Les isolats font probablement partie de l'épidémie |
| Probablement liés | 2 | 4-6 | Les isolats sont peut être liés à l'épidémie |
| Différents | ≥ 3 | ≥ 7 | Les isolats ne font pas partie de l'épidémie |

12. Les tests statistiques

L'analyse statistique a été réalisée *via* le logiciel SPSS (SPSS version 20, IBM, Chicago, USA). Les comparaisons statistiques ont été effectuées par le test du χ^2 et le test exact de Fisher. La valeur p inférieure ou égale à 0,05 a été considérée statistiquement significative.

L'analyse des correspondances multiples est une méthode exploratoire multidimensionnelle qui fournit une représentation synthétique des catégories issues d'une batterie de critères qualitatifs.

Dans notre étude, nous avons utilisé, l'analyse factorielle dans le but de réduire un nombre important d'informations (prenant la forme de valeurs sur des variables) à quelques grandes dimensions. Elle remplace un tableau de nombres difficile à analyser par une série de tableaux plus simples qui sont une bonne approximation de celui-ci. Ces tableaux sont simples, car ils sont exprimables sous forme de graphiques.



RESULTATS

Résultats

1. Isolement et identification des souches bactériennes

Cent dix (110) souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de 460 prélèvements réalisés au niveau de trois centres hospitalo-universitaires (CHU) de la ville d'Annaba, dont 74 souches ont été isolées au niveau du CHU d'Ibn Sina, 21 souches au niveau du CHU de Dorban et 14 souches au niveau du CHU d'Ibn Rochd.

Sur une période d'étude allant de janvier 2013 à avril 2015, les souches de *P. aeruginosa* isolées ont été identifiées par galerie API 20 NE (Biomérieux, Meylan, France) ce qui a permis de mettre en évidence :

- les principaux caractères biochimiques du genre *Pseudomonas* : réduction des nitrates en nitrites, attaque du glucose par voie oxydative, présence d'une arginine dihydrolase et utilisation du glucose comme seule source de carbone.
- L'assignation des souches à l'espèce *aeruginosa* a été réalisée grâce à la présence d'une gélatinase, à l'assimilation de l'acide adipique, une oxydase positive ainsi qu'à la possibilité de culture à une température de 42° C et à la production d'une odeur aromatique particulière.

La fréquence d'isolement des souches de *P.aeruginosa* par rapport au nombre total de bactéries isolées de patients hospitalisés dans le CHU d'Annaba qui s'est étalée durant la période de l'étude est de 23.9%. Dans le service des Brulés la fréquence d'isolement était remarquable (60%), sur 50 prélèvements, 30 étaient positifs par la présence de cette bactérie.

1.1. Répartition des souches par service

La répartition des souches de *P.aeruginosa* isolées par service est donnée dans la figure(Fig07). On note que le service d'endocrinologie semble être le plus incriminé avec 40% des isolats, suivi par le service des brulés (28%) et du service d'ORL (14%).

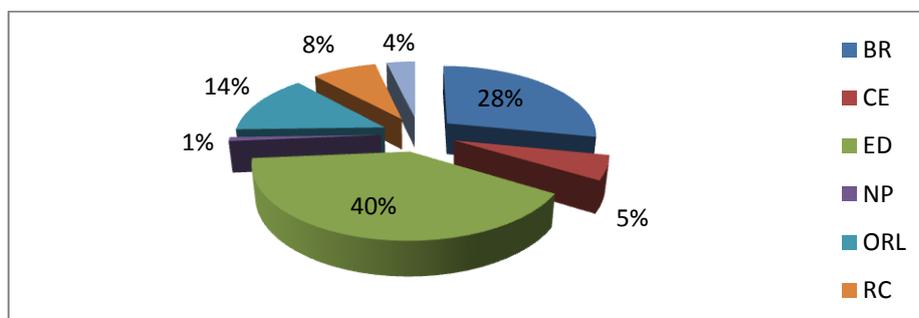


Figure 07 : Répartition des souches par service

Résultats

1.2. Répartition des souches selon le type de prélèvements

Comme le montre la figure (Fig08), les souches de *P.aeruginosa* ont été isolées à partir de divers prélèvements, surtout de pus divers qui représente 78 % de tout les prélèvements, ces pus sont issus des prélèvements cutanés par écouvillonnage au niveau des deux services les plus incriminés (endocrinologie et brûlé), souvent pour ces pus divers l'infection était polymicrobienne associée aux espèces du genre *Staphylococcus* ou bien associée aux Entérobactéries spécifiquement *K.pneumoniae* et *E. coli*.

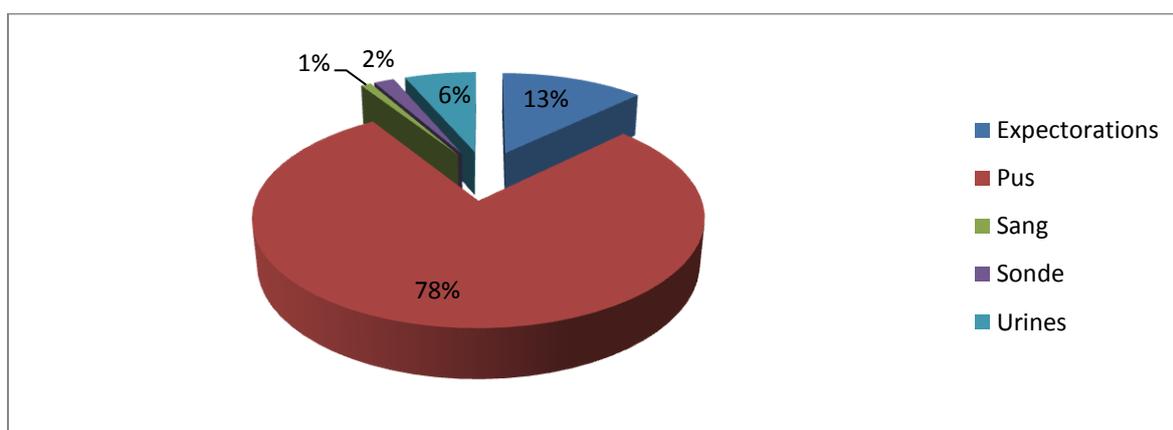


Figure 08 : Répartition des souches selon le type de prélèvement

1.3. Caractéristiques de la population

• Age

L'âge moyen des patients chez lesquels ces souches sont isolées durant la première période allant de 2013-2014 est de 47 ans. Pour les isolats issus des brûlés l'âge moyen est de 39 ans.

• Sexe

Sur l'ensemble des patients hospitalisés au niveau des trois CHU, une prédominance masculine est observée dans la distribution de la population d'étude avec une sex-ratio égale à 3,2.

Résultats

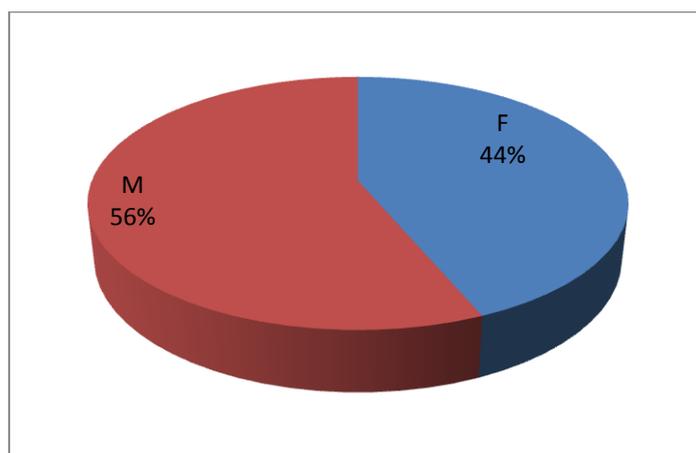


Figure 09 : Répartition des souches selon le sexe des patients

- **Sondage urinaire**

Les souches résistantes de type CRPA sont isolées chez 13.3% (2/15) des patients sondés, également pour les souches résistantes de types CazR sont isolées chez 14.28% contre 11.62.5% des souches CSPA. Dans le service des brûlés, la proportion des patients ayant été exposé au sondage urinaire est de 55%. La durée moyenne de sondage urinaire est de 13,4 \pm 1,4 jour avec des extrêmes allant de 1 à 94 jours, soit une étendue de 93 jours.

- **Taux de résistance par service**

Le taux de résistance retrouvé dans le service de Brulé est plus élevé par rapport aux taux observés dans les services d'endocrinologie et de réanimation chirurgicale. Aucune souche résistante n'a été isolée à partir des services de néphrologie, ORL et de réanimation médicale. (Tableau 13).

Tableau 13 : Répartition des taux de résistance des souches par service

| Services | BR | CE | ED | RC |
|-------------------------------------|----|-------|-------|-------|
| Nombre total de souches isolées | 30 | 6 | 45 | 9 |
| Nombre total de souches résistantes | 15 | 2 | 13 | 1 |
| % | 50 | 33.33 | 28.88 | 11.11 |

Résultats

- **Taux de résistance par type de prélèvement**

Le tableau 14 donne les taux de résistance retrouvés pour chaque type de prélèvement.

Aucune souche résistante n'a été isolée à partir des expectorations.

Tableau 14 : Répartition des taux de résistance des souches par type de prélèvements

| Origine | Pus | Sonde | Urine |
|--|-------|-------|-------|
| Nombre total de souches isolées | 86 | 1 | 7 |
| Nombre total de souches résistantes | 28 | 1 | 2 |
| % | 32.55 | 100 | 28.57 |

- **Analyse des facteurs de risque associés à la multirésistance**

L'analyse des facteurs de risque favorisant la résistance a concerné les patients qui ont une infection nosocomiale à *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes (CRPA) et un groupe témoin concernant les patients qui ont une infection nosocomiale à *P.aeruginosa* sensibles aux carbapénèmes (CSPA), Pour les patients admis dans le service des Brulés, également un groupe témoin a été inclus concernant les patients qui n'ont pas présenté une infection à *P.aeruginosa*. L'analyse des facteurs de risque associés à ces groupes pour les deux études sont présenté dans les tableaux 15 et 17.

Résultats

Tableau15 : Les facteurs de risque associés à la multirésistance durant la première étude

| Variables | CRPA (n=15) | CSPA (n=65) | P-value |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Age | 47.54±12.7 | 47.45±20.88 | 0.5 |
| Sexe | | | |
| Femme | 5(33.34) | 27(41.53) | 0.57 |
| Homme | 10(66.66) | 38(58.46) | 0.60 |
| Sex-ratio | 0.5 | 0.68 | |
| Durée d'hospitalisation (jours) | 82.5±45.82 | 63.44±48.82 | 0.04 |
| Services | | | |
| ORL | 0 | 15(23.07) | 0.06 |
| Endocrinologie | 9(60) | 35(53.85) | 0.70 |
| Réanimation chirurgicale | 3(20) | 6(9.23) | 0.36 |
| Réanimation médicale | 0 | 4(6.15) | 1 |
| Consultation externe | 3(20) | 4(6.15) | 0.12 |
| Type de prélèvements | | | |
| Pus | 9(60) | 46(70.76) | 0.3 |
| Urines | 4(26.66) | 5(7.7) | 0.08 |
| Sang | 1(6.66) | 0 | 0.18 |
| Expectorations | 1(6.66) | 9(13.84) | 0.6 |
| PDP | 0 | 4(6.15) | 1 |
| Motifs d'hospitalisation | | | |
| Traumatisme | 3(20) | 6(9.23) | 0.36 |
| Diabète | 7(46.66) | 35(53.85) | 0.5 |
| Otites | 0 | 7(10.77) | 0.03 |
| Bronchopneumopathie | 0 | 4(6.15) | 1 |
| Insuffisance rénal | 0 | 2(3.07) | 1 |
| Autres | 0 | 6(9.23) | 0.5 |
| Antibiothérapie à l'admission | 11(73.34) | 59(90.76) | 0.03 |
| C3G | 10(66.67) | 44(67.69) | 1 |
| aminoglycoside | 1(6.66) | 12(18.46) | 0.4 |
| fluoroquinolone | 0 | 2(3.07) | 1 |
| Sans antibiothérapie | 4(26.66) | 7(10.77) | 0.2 |
| Type d'acte adhésif | 3(20) | 12(18.46) | 1 |
| Sondage urinaire | 3(20) | 2(3.07) | 0.04 |
| Intubation | 0 | 5(7.7) | 0.5 |
| Intubation + Sondage urinaire | 0 | 5(7.7) | 0.5 |
| Infection polymicrobienne | 9(60) | 33(50.77) | 0.5 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1(6.66) | 1(1.53) | 0.3 |
| <i>S. aureus</i> | 5(33.34) | 6(9.23) | 0.01 |
| <i>E. coli</i> | 2(13.33) | 8(12.30) | 1 |
| <i>S.aureus</i> + <i>E. coli</i> | 1(6.66) | 4(6.15) | 1 |
| <i>S. aureus</i> + <i>P. mirabilis</i> | 0 | 10(15.38) | 0.19 |
| <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> | 0 | 3(4.61) | 1 |
| | | | |
| Décès | 2(13.33) | 1(1.53) | 0.09 |

Résultats

Les patients qui ont présenté une infection à *P.aeruginosa* sont au nombre de 80 dont 15 répondent à la définition du cas. Ces quinze patients présentaient une infection à *P.aeruginosa* résistant à l'imipénème « CRPA » (18,75%; 95% intervalle de confiance: 10,2 à 27,3) et 65 patients avaient des infections à *P.aeruginosa* sensible à l'imipénème « CSPA ».

La répartition selon le sexe était similaire chez les cas et les témoins (33.34% contre 41.53% des femmes, et 66.66% contre 58.46% des hommes respectivement, $p=0,6$). L'âge médian étant de 45 ans pour les patients dans le groupe CRPA et 51 années pour le groupe CSPA ($p=0,5$), sans différence significative entre les deux groupes, en utilisant des tests paramétrique (pour la moyenne) ou non paramétrique (par médiane).

La durée d'hospitalisation avant l'infection était significativement plus longue pour le groupe CRPA par rapport au groupe CSPA avec une médiane de 82.5 ± 45.82 jours contre 63.44 ± 48.82 jours respectivement (19.5 contre 5.5 jours, $p < 0.04$).

L'analyse bivariée a montré une association statistiquement significative entre l'utilisation des cathéters, un antécédent d'hospitalisation et la co-infection par *Staphylococcus aureus* avec l'infection à CRPA. Le traitement de l'infection à *P. aeruginosa* était incorrect dans 57 des 80 patients (71,20%) (Tableau 15). L'exposition à l'imipénème est aussi associée à l'infection par CRPA. L'utilisation de l'imipénème est très significative ($p= 0.005$) avec l'acquisition de l'infection par CRPA (Tableau 16).

La mortalité des patients souffrant d'infection à *P.aeruginosa* était de 1,53% pour le groupe de CSPA et 13,34% pour les patients avec CRPA, sans différence significative entre les deux groupes. L'analyse multivariée par régression logistique montre que l'utilisation des cathéters, l'exposition à l'imipénème et l'infection à *S.aureus* sont des facteurs de risque indépendants à la résistance de *P.aeruginosa* à l'imipénème.

Tableau 16: Les antibiotiques administrés aux patients hospitalisés ($n=44$) avant l'isolement de *P.aeruginosa*

| B-lactamines | IMP-R | IMP-S | P-value |
|------------------------|-------|-------|---------|
| C3G | | | |
| Cefotaxime (calforan®) | 10 | 42 | 0.9 |
| cefexime | 0 | 1 | 1 |
| ceftriaxone | 0 | 1 | 1 |
| Carbapénème | | | |
| Imipenem (Teinam ®) | 3 | 0 | 0.005 |

Résultats

Tableau 17 : Les facteurs de risque associés à la multirésistance de *P.aeruginosa* dans le service des brûlés

| Facteurs de risque | Patients infectés par <i>P. aeruginosa</i> %(n) | | | | patients non infecté par <i>P. aeruginosa</i> %(n) | P-value |
|--|---|----------|---------|------------------|--|---------|
| | CRPA | CSPA | P-value | Tous les isolats | | |
| Sexe | | | | | | |
| Masculin | 66.7(10) | 46.7(7) | NS | 53.3(16) | 50(10) | NS |
| Féminin | 33.3(5) | 53.3(8) | NS | 46.7(14) | 50(10) | NS |
| Age (ans) | | | | | | |
| Age moyen | 44.6 | 35.1 | NS | 39.7 | 46.76 | NS |
| Age médian | 20.44 | 20.12 | NS | 20.51 | 20.57 | NS |
| Durée d'hospitalisation (jours) | | | | | | |
| [1-30] | 33.3(5) | 13.3(2) | NS | 23.3(7) | 40(8) | NS |
| [30-60] | 13.3(2) | 33.3(5) | NS | 23.3(7) | 40(8) | NS |
| [60-90] | 0 | 6.7(1) | NS | 3.3(1) | 15(3) | NS |
| [90-120] | 20(8) | 46.7(7) | NS | 51.6 (16) | 5(1) | 0.0006 |
| Cause de brûlure | | | | | | |
| Electricité | 26.7(4) | 20(3) | NS | 23.3(7) | 10(2) | NS |
| Explosion de gaz | 46.7(7) | 46.7(7) | NS | 46.7(14) | 55(11) | NS |
| Eau chaude | 20(3) | 33.3(5) | NS | 26.7(8) | 35(7) | NS |
| Autres | 6.7(1) | 6.7(1) | NS | 6.7(2) | 0 | NS |
| Degré de brûlure | | | | | | |
| 1 ^{er} +2 ^{ème} degré (Profond) | 6.7(1) | 0 | NS | 3.3(1) | 5(1) | NS |
| 2 ^{ème} degré (Profond) | 26.7(4) | 40(6) | NS | 33.3(10) | 40(8) | NS |
| 2 ^{ème} +3 ^{ème} degré (Profond) | 53.3(8) | 60(9) | NS | 56.7(17) | 50(10) | NS |
| 3 ^{ème} degré (profond) | 6.7(1) | 0 | NS | 3.3(1) | 5(1) | NS |
| 2 ^{ème} degré (superficiel) | 6.7(1) | 0 | NS | 3.3(1) | 5(1) | NS |
| Antibiothérapie à l'admission | | | | | | |
| Aminoglycoside | 80(12) | 46.7(7) | NS | 63.3(19) | 70(14) | NS |
| Macrolide | 0 | 20(3) | NS | 10(3) | 40(8) | 0.017 |
| Fluoroquinolone | 66.7(10) | 66.7(10) | NS | 66.7(20) | 45(9) | NS |
| Céphalosporine 3 ^{ème} Génération | 6.7(1) | 33.3(5) | NS | 20(6) | 25(5) | NS |
| Carbapénème | 33.3(5) | 20(3) | NS | 26.7(8) | 5(1) | NS |
| Actes Invasive | | | | | | |
| Intubation | 26.7(4) | 26.7(4) | NS | 26.7(8) | 5(1) | NS |
| Intubation+sondage urinaire | 60(9) | 13.3(2) | 0.008 | 36.7(8) | 15(3) | NS |
| Intervention chirurgicale | | | | | | |
| Oui | 60(9) | 68.7(11) | NS | 66.7(20) | 40(8) | NS |
| Non | 40(6) | 26.6(4) | NS | 33.3(10) | 65(12) | NS |
| Infection polymicrobienne | | | | | | |
| Oui | 93.3(14) | 80(12) | NS | 86.7(26) | 5 | <0.0001 |
| Non | 6.7(1) | 20(3) | NS | 13.3(4) | 95 | NS |
| Décès | | | | | | |
| Oui | 46.7(7) | 33.3(5) | NS | 40(12) | NA | NA |
| Non | 53.3(8) | 66.7(10) | NS | 63.3(19) | NA | NA |

Résultats

Dans le service des brûlés, un total de 50 patients a été inclus dans cette étude, sur les 30 patients infectés par *P. aeruginosa*, 15 répondent à la définition de cas (CRPA) et ils ont été comparés avec 15 patients répondant à la définition de témoin(CSPA). Il n' ya pas de différence significative entre les deux groupes en ce qui concerne les caractéristiques démographiques. La répartition selon le sexe était similaire chez les cas et les témoins 48% de femmes (F) et 52% des hommes (M) respectivement avec une sex-ratio de 1.08. L'âge médian était de 39,5 dans le groupe CRPA et 44 ans dans le groupe CSPA, sans différence significative entre les deux groupes, en utilisant des tests paramétrique (pour la moyenne) ou non paramétrique (par médiane). La durée d'hospitalisation était différente entre les groupes (CSPA et CRPA), elle était plus longue pour le groupe CRPA par rapport au groupe CSPA. Par ailleurs, notre analyse a montré qu'une comparaison entre les patients infectés et non infectés a révélé que la durée d'hospitalisation de 90-120 jours était statistiquement très significative et elle est associée à l'infection par CRPA ($p=0.0006$). (Tableau 17).

L'usage de plusieurs antibiotiques surtout de type macrolide, une infection polymicrobienne ainsi que l'utilisation des cathéters sont statistiquement significative et sont associés à l'infection par CRPA. La mortalité des patients infectés par *P. aeruginosa* était de 46,7% pour les patients avec CRPA et 33,3% pour les patients avec CSPA sans différences significatives entre les deux groupes. (Tableau 17).

Résultats

2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

2.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion sur gélose

Sur l'ensemble des souches isolées, 93.63% sont multirésistantes, 07 des souches isolées ont présenté un phénotype sauvage. Les 80 souches de *P. aeruginosa* isolés durant la période allant de 2013 à 2014 ont montré différents niveaux de résistance vis-à-vis des antibiotiques, mis à part la colistine, à laquelle tous les isolats étaient sensibles. (Fig 10).

Des taux de résistance de 18.75% à l'Imipénème, 61.25% à la Ticarcilline, 56.25% à la Ticarcilline+ acide clavulanique, 36.25% à la Pipéracilline, 36,7% à la Pipéracilline+ tazobactam, 56.25% à la Ceftazidime et 41.25% à l'Aztréonam sont observés. Les taux de résistance aux aminosides sont respectivement: Gentamicine (21.75%), Tobramycine (30.4%) et Amikacine (7,6%). Pour les fluoroquinolones, un taux de résistance important a été observé pour la Ciprofloxacine (43.75%).

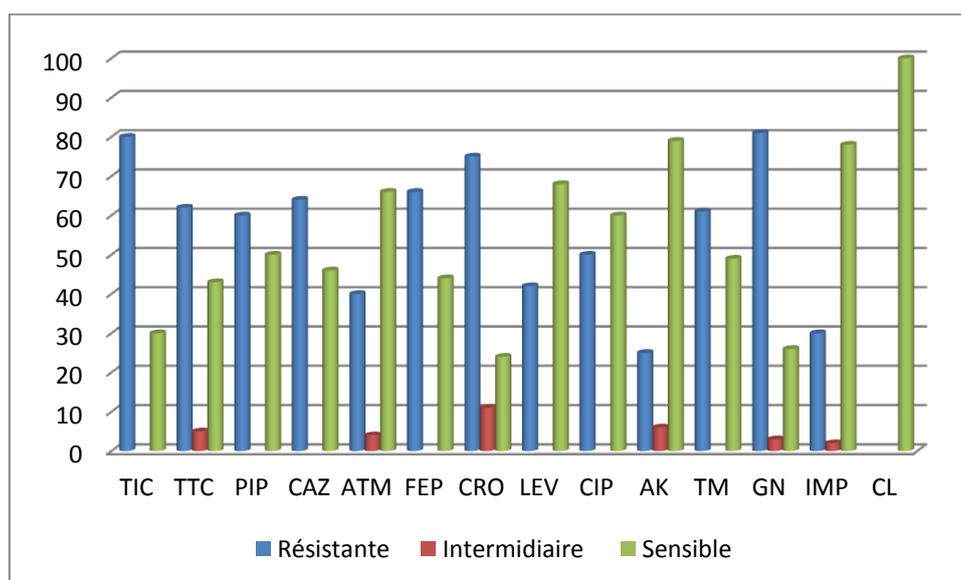


Figure10 : Sensibilité aux antibiotiques des 110 souches de *P.aeruginosa*.

Les niveaux de résistance étaient nettement plus élevés au niveau du service des brûlés durant la période allant de 2014 jusqu'à 2015 sur un échantillonnage de 30 isolats (Fig 11), les bacilles pyocyaniques isolées ont montré un taux élevé de résistance aux différents antibiotiques testés. En effet, on note une résistance très élevée vis-à-vis des β -lactamines, les taux de résistance observés étaient les suivants : la Ticarcilline (100%) , la Ticarcilline associé à l'acide clavulanique(70.90%), la Ceftazidime(96.70%), la Pipéracilline(96.7%), la Pipéracilline associé à la tazobactam(96.7%), la Céfépime(96%), la Céftriaxone(93.5%), et l'Aztreonam (32.2%) . Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée

Résultats

pour la gentamicine de 80.6% suivi par 48.4% pour l'amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux de résistance de 22.5% a été détecté pour la ciprofloxacine et la lévofloxacine respectivement ; quant aux sulfamides et la colistine, ces derniers restent actifs sur 50% et 100% de souches étudiées respectivement.

Pour l'imipénème, les résultats révèlent un taux de résistance de 50% au niveau de ce service.

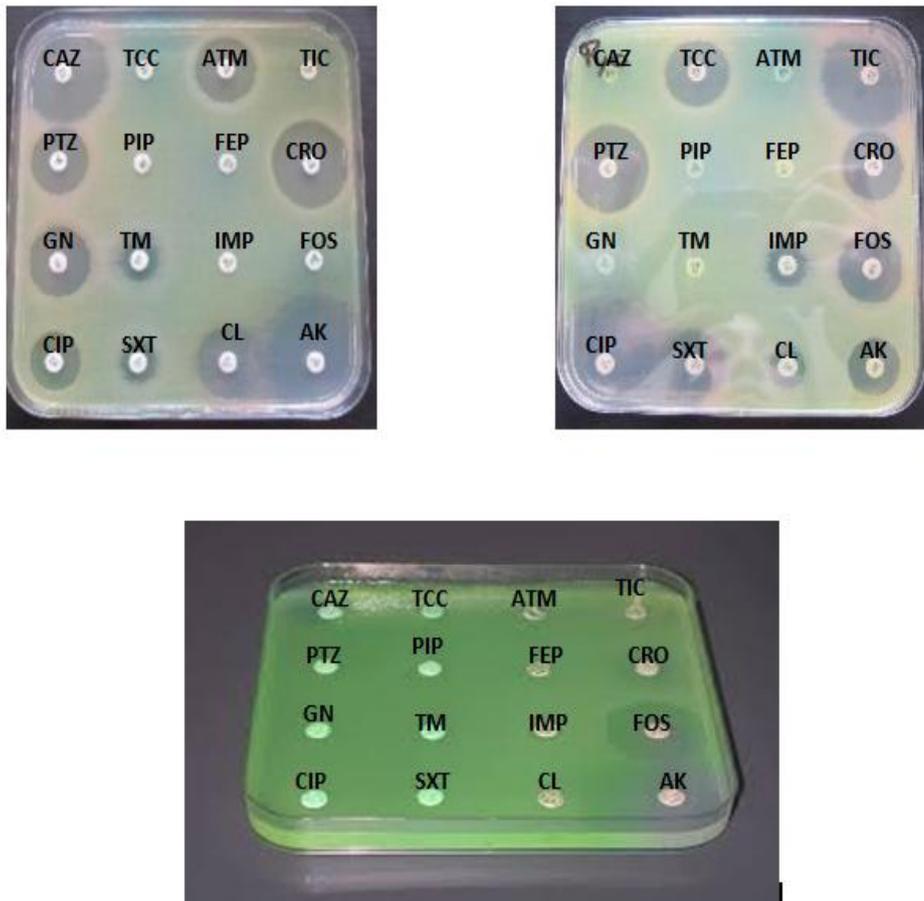


Photo 01 : Antibiogramme des souches de *P.aeruginosa* multirésistantes

2.2. Détermination des phénotypes de résistance aux bêtalactamines

L'utilisation d'antibiotiques comme marqueurs de détection phénotypique a permis de mettre en évidence les différents phénotypes de résistance aux β -lactamines rencontrés (tableau 18), L'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique a été observée seule ou associée à une perte de porine D2. Ce phénotype a été confirmé par la restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération (C3G) en présence de concentration définie de cloxacilline (Photo 02).

Résultats

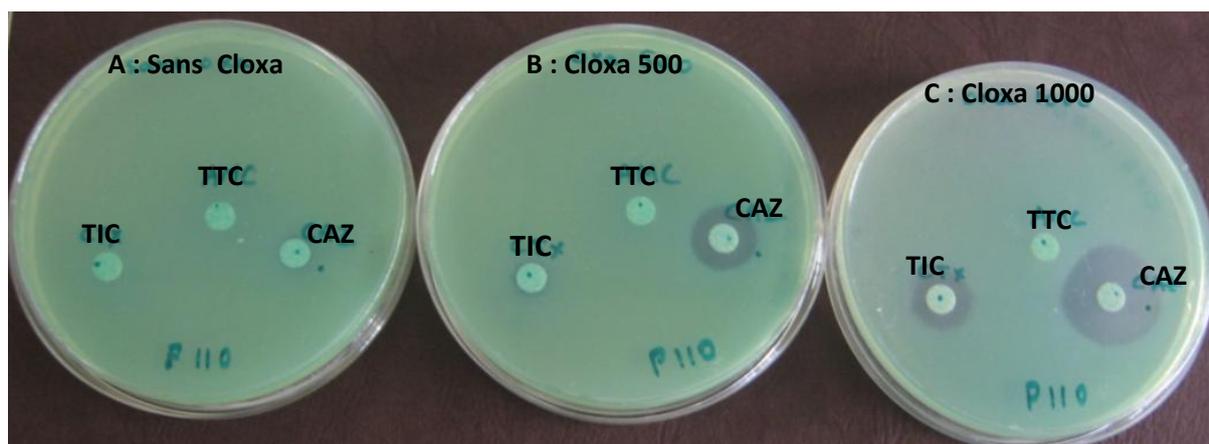


Photo 02 : Teste de Cloxacilline. **A :** souche de *P.aeruginosa* sans cloxacilline. **B :** La même souche en présence d'une concentration de 500 μ g/ml de cloxacilline. **C :** En présence d'une concentration de 1000 μ g/ml.

Une concentration de 1000 μ g/ml permettait de récupérer l'activité des deux C3G utilisées alors que celle de 500 μ g/ml ne restaurait que celle de la ceftazidime. En ce qui concerne la P27, l'inhibition de la céphalosporinase a permis de mettre en évidence la présence d'une pénicillinase associée.

Le caractère inductible de la céphalosporinase partiellement dérprimée exprimée par la P110 a été démontré par une image d'antagonisme entre l'imipénème et les céphalosporines à large spectre ainsi que par une diminution de l'activité de la ticarcilline par l'acide clavulanique.

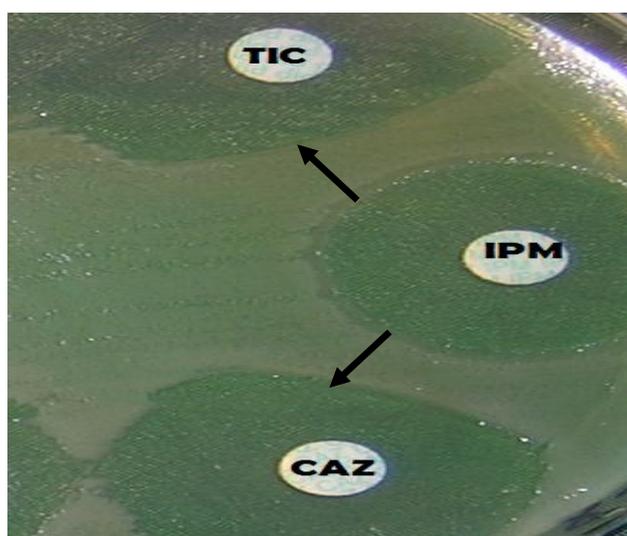


Photo 03 : Le caractère inductible de la céphalosporinase partiellement dérprimée

Résultats

Tableau18 : Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les services

| Service | CASE | EFFLUX | oprD | MBL | EFFLUX + | CASE + | MBL+ | Sauvage |
|-------------------------------------|------|--------|------|-----|-------------|-----------|------|---------|
| | | | | | oprD | oprD | CASE | |
| Brûlé | 21 | 9 | 11 | 7 | 1 | 10 | 7 | |
| Endocrinologie | 14 | 24 | 9 | | 1 | 8 | | 4 |
| Ambulatoire | 6 | 3 | 1 | | | 1 | | 1 |
| Néphrologie | | 1 | | | | | | |
| ORL | | 10 | 2 | | 2 | | | |
| Réanimation chirurgicale | 4 | 4 | 4 | | | 4 | | 1 |
| Réanimation médicale | 1 | 2 | | | | | | 1 |

Le phénotype d'efflux vient en première position, avec 48.18% des souches, en proportion très élevée au sein de service d'endocrinologie (53.33%).

Le phénotype de résistance à l'imipénème vient en seconde position avec 24.54% de souches présentant le phénotype « porine OprD déficiente », On peut aussi noter que ce taux atteint 37% au niveau de service de brûlé. Ce phénotype est trouvé également associé à d'autres mécanismes de résistances aux β -lactamines, la présence de ce phénotype associé avec le phénotype d'efflux est rencontrée chez 3.36% des souches.

Ainsi que sept souches productrices de métallo- β -lactamases selon le résultat positif au test d'EDTA isolées exclusivement au niveau du service de brûlé (6.36%) augmentant ainsi le pourcentage de la résistance à l'imipénème.

La caractérisation phénotypique du mécanisme de l'hyperproduction de céphalosporinases a été confirmée par la restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ième} génération sur gélose Mueller-Hinton additionnée d'une concentration définie de cloxacilline. Ce phénotype est présenté par 41.81% des souches, seule ou associée au phénotype « porine OprD déficiente » (20.90%), aussi il est trouvé associé au phénotype MBL (6.63%), l'association entre ces deux phénotypes a été retrouvée exclusivement au sein des souches isolées au niveau du service de brûlé.

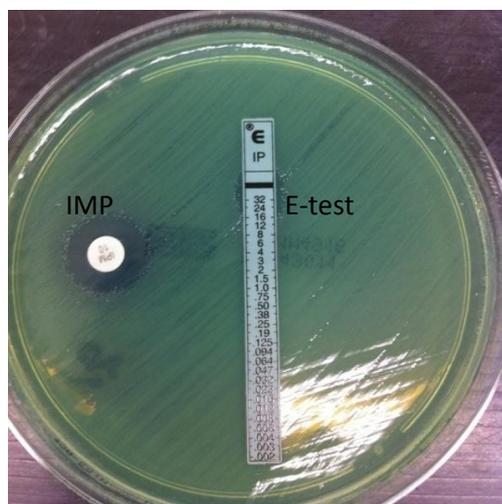
Le phénotype sauvage regroupant les souches n'ayant acquies aucune résistance aux antibiotiques, représente le phénotype le plus faible au sein des trois CHU inclus dans notre étude avec 7% du total des souches.

2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Les valeurs absolues des CMI de l'imipénème des 30 souches *P.aeruginosa* résistantes oscillent dans un intervalle allant de 8mg/L à plus de 64 mg/L. Ce sont des niveaux très élevés

Résultats

de résistance. Par ailleurs, ces mêmes souches, sont aussi résistantes aux fluoroquinolones et aux aminosides. Nous pouvons sans doute parler de souches, non seulement multirésistantes mais de hauts niveaux de résistance.



(I)



(II)

Photo 04 : Concentrations minimales inhibitrices par E-test. (I) souche de *P. aeruginosa* résistante à l'imipénème. (II) détection des MBL par bandelette E-test.

2.4. Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMI) des souches PA-MBL

Un Analyseur de microbiologie automatisée (VITEK-AMS) utilise GNI carte (Biomérieux, France) a été utilisé pour déterminer les différentes CMI de 17 antibiotiques pour les sept souches productrice de MBL. Les résultats obtenus pour chaque souche sont présentés dans les tableaux (voir Annexe).

Tableau 19 : Les concentrations minimales inhibitrices obtenues pour la souche 04

| Antibiotiques | CMI | Interprétation |
|---------------------------------|------|----------------|
| Ticarcilline | ≥128 | R |
| Ticarcilline/acide clavulanique | ≥128 | R |
| Pipéracilline | ≥128 | R |
| Pipéracilline/tazobactam | ≥128 | R |
| Ceftazidime | ≥64 | R |
| Céfépime | ≥64 | R |
| Imipénème | ≥32 | R |
| Méropénème | ≥16 | R |
| Amikacine | ≥64 | R |

Résultats

| | | |
|--------------------------------|------|---|
| Gentamicine | ≥64 | R |
| Tobramycine | ≥16 | R |
| Ciprofloxacine | 0,5 | S |
| Péfloxacine | 1 | S |
| Minocycline | ≥16 | R |
| Colistine | 2 | S |
| Rifampicine | ≥32 | R |
| Triméthoprime/sulfaméthoxazole | ≥320 | R |

Les 07 souches productrices de MBL ont montré toutes un niveau de résistance très élevé à tous les β -lactamines. Les CMI de la céftazidime étaient rangées de 16 à >128 $\mu\text{g/ml}$, la céfépime à partir de 64 à >128 $\mu\text{g/ml}$; contrairement à l'aztréonam, les souches MBL+ ont été toutes sensible. La résistance des souches aux aminosides et aux fluoroquinolones était également remarquable: 6 (85.7%) souches sont résistantes la gentamicine de 32 à > 64 $\mu\text{g/ml}$, 85% à l'amikacine avec des CMI de > 64 $\mu\text{g/ml}$., Aussi toutes les souches de PA-MBL étaient résistantes aux triméthoprime- sulfaméthoxazole avec des CMI supérieures à 320 $\mu\text{g/ml}$, à la rifampicine avec des CMI supérieures à 32 $\mu\text{g/ml}$ et à la minocycline avec des CMI supérieures à 16 $\mu\text{g/ml}$. Finalement, Toute les souches testées étaient sensible à la ciprofloxacine avec des CMI qui varient entre 0.5 et 1 $\mu\text{g/ml}$, à la péfloxacine avec des CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$ et à la colistine avec des CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$.

3. Recherche phénotypique des carbapénèmases

3.1. Test de synergie EDTA-IMP : Détection des métallo- β -lactamases (M β L)

Le résultat du test de synergie EDTA-IMP des 30 souches de *P.aeruginosa* résistants à l'imipénème, nous montre après une incubation de 24heures à 37°C :

« Pour chaque souche, on a effectué deux méthodes sur la même boîteensemencée »

- **Première méthode :**

« Deux disques d'antibiotiques d'imipénème l'un d'eux comporte de l'EDTA » : nous avons observé chez 7 souches de *P. aeruginosa* une synergie entre les deux disques. Ce qui confirme que les 7 souches sont productrices d'une Metallo- β -lactamase (M β L).

- **Deuxième méthode :**

« Un disque d'imipénème et un disque vierge » : on remarque que le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au

Résultats

moins 6mm chez les 7 souches de *P. aeruginosa*. On peut donc les considérer comme des souches productrices de MBL.

Tous ses isolats présentant un résultat positif sont issus du service des brûlés.

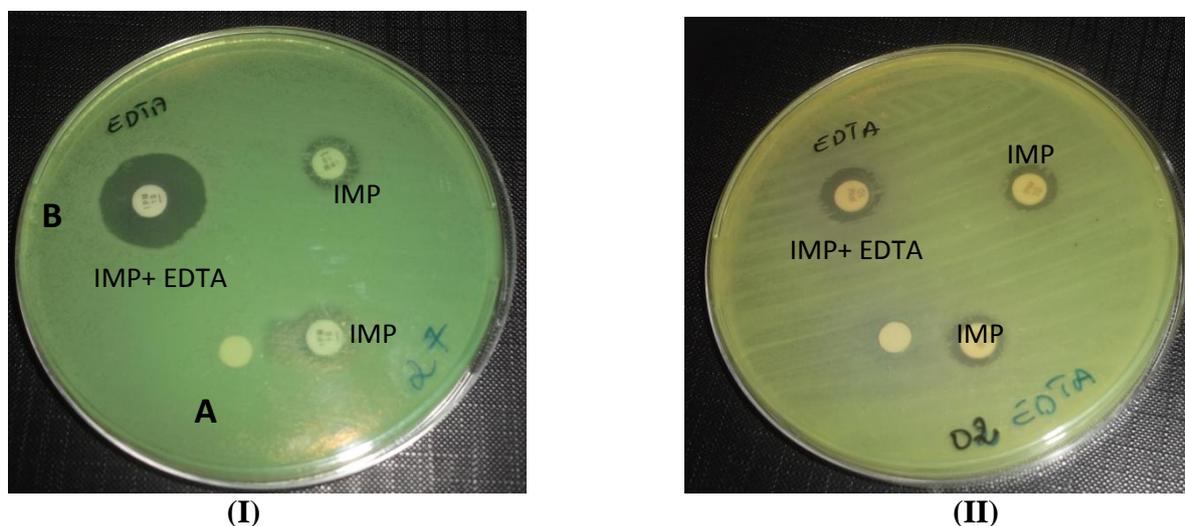


Photo 05 : (I) : Test de synergie EDTA-IMP chez des souches *P. aeruginosa* productrice d'une carbapénèmase. (A) Un disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA (B) deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA. (II) : Test de synergie EDTA-IMP chez une souche de *P. aeruginosa* qui n'est pas productrice d'une carbapénèmase.

3.2. Test de Hodge

Parmi les 30 souches de *P.aeruginosa* résistantes à l'imipénème, 23 qui sont résistantes à l'imipénème et présentant un test EDTA-IMP négatif sont testées avec le test de Hodge pour la recherche de d'autres types de carbapénèmases. (Fig 15).

Le test de Hodge est positif lorsque la déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques) indique la présence d'une carbapénèmase. Le résultat obtenu est négatif pour toutes les souches testées.

3.3. Test Carba NP modifié

C'est un test très rapide développé récemment par Bakour.S et al. permet la détection des différents types de carbapénèmases (KPC, MBL, et OXA), après 15 minutes à 2 heures. Il se base sur le virage du couleur de l'indicateur de pH du rouge vers l'orange ou le jaune lorsque le milieu devient acide, traduisant l'hydrolyse de l'imipénème. (Photo 06). Sur les 30 souches résistantes à l'imipénème ce test a confirmé la production de MBL par les 7 souches qui ont

Résultats

donné un résultat positif par le test IMP-EDTA et également a confirmé le résultat négatif du test de Hodge pour le reste des isolats.



Photo 06 : **A :** un tube contenant une solution de rouge de phénol **B :** un tube contenant une solution de rouge de phénol additionné de 6 mg / ml d'imipénème et la souche MBL+.

4. Détermination des supports génétiques de la résistance

4.1. Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases

Le résultat de la PCR standard des gènes codant pour une carbapénémase de type métallob- β -lactamase, après une électrophorèse sur gel d'agarose, montre que sur les 30 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, 7 sont positives au gène blaVIM, ce qui confirme le test de synergie EDTA-IMP. Le séquençage de ce fragment et l'alignement des séquences ont permis d'identifier deux types de gène VIM ; blaVIM-2 chez la souche pa27 et blaVIM-4, chez les 6 autres souches (pa4, pa8, pa9, pa10, pa11, pa12) toutes ces souches sont issues du service des brûlés. (Fig16).

Résultats

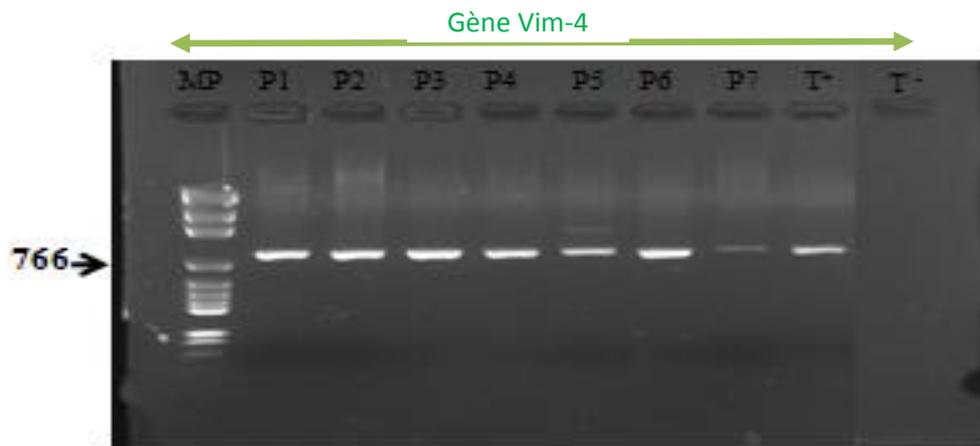


Photo 07 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *blavim*.

MP: marqueur de tailles de l'ADN, +: témoin positif, -: témoin négatif

Aucune souche ne possède *blagim*, *blanDM-1*, *blaimP*, et *blakPC*.

4.2. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu

Pour les souches résistantes aux β -lactamines, des PCR ont été réalisées pour la recherche de gènes codant les β -lactamases suivantes : CTX-M, SHV, PSE, GES, TEM, PER, VEB.

Seul le gène *blaPSE* a pu être identifié chez une seule souche (Photo 08).

Les résultats étaient négatifs pour les autres PCR effectuées. Le séquençage a permis d'identifier le gène *blaPSE-1*.



Photo 08 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *blaPSE-1*

MP: marqueur de tailles de l'ADN, +: témoin positif, -: témoin négatif

Résultats

5. Recherche moléculaire de la résistance associée

5.1. Résistance aux aminosides

5.1.1. Les enzymes modifcatrices des aminosides

En ce qui concerne la résistance aux aminosides, la PCR standard et le séquençage des gènes qui codent pour les enzymes modifcatrices des aminosides ont fait apparaitre, la présence de 5 (16.6%) de souches de CRPA qui portent le gène *aac(3')-II* (Photo 09).

La PCR effectuée pour le gène *aac(6')* s'est avérée négative.

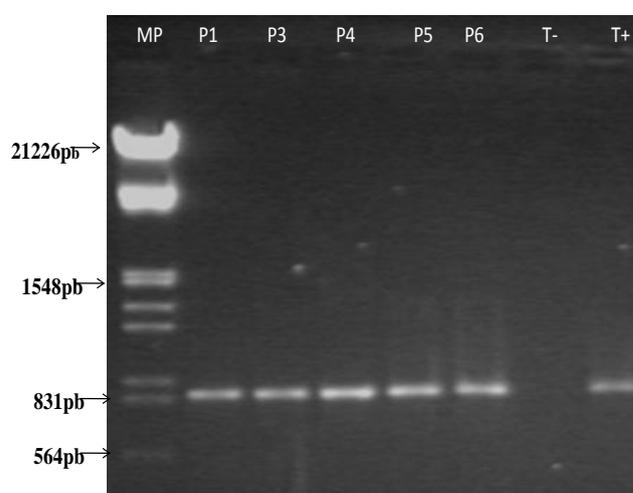


Photo 09 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *aac(3')-II*

MP: marqueur de tailles de l'ADN, +: témoin positif, -: témoin négatif, **pb** : paire de bases.

5.1.2. Les 16S ARNr méthyltransférases

La PCR et le séquençage ont montré qu'une seule souche CRPA possède le gène *rmtB* qui code pour le 16s ARNr méthyltransférase responsable de la résistance élevée à tous les aminosides. Cette souche (pa27) elle produit également une métallo- β -lactamase de type VIM-2, elle est résistante à la fosfomycine et elle a exprimé de hauts niveaux de CMI > 16-64 μ g/ml à l'égard de la gentamicine et également à l'amikacine.

Résultats

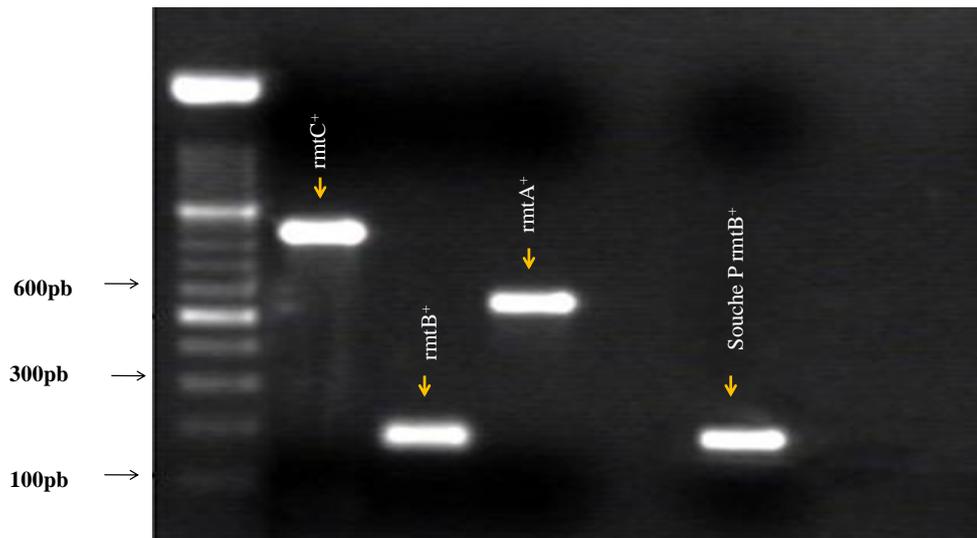


Photo 10 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits d'amplification par PCR du gène *rmtB*

5.2. Résistance aux quinolones

La résistance aux quinolones a été observée pour toutes les souches multirésistantes.

L'amplification par PCR standard et le séquençage ont montré que 2 (6.6%) des souches CRPA (pa27 et pa8) isolées dans cette étude possèdent le gène *qnrB* qui code pour la résistance aux fluoroquinolones. Ces deux souches produisaient simultanément une VIM-4 (pa8), pour l'autre (pa27) produisait VIM-2 et également le gène *rmtB*. (Photo 11).

Pour le reste des souches résistantes et qui ont donné un résultat négatif par PCR la résistance pourrait être expliquée soit par une mutation de la gyrase et de la topoisomérase soit par un mécanisme non enzymatique.

Résultats

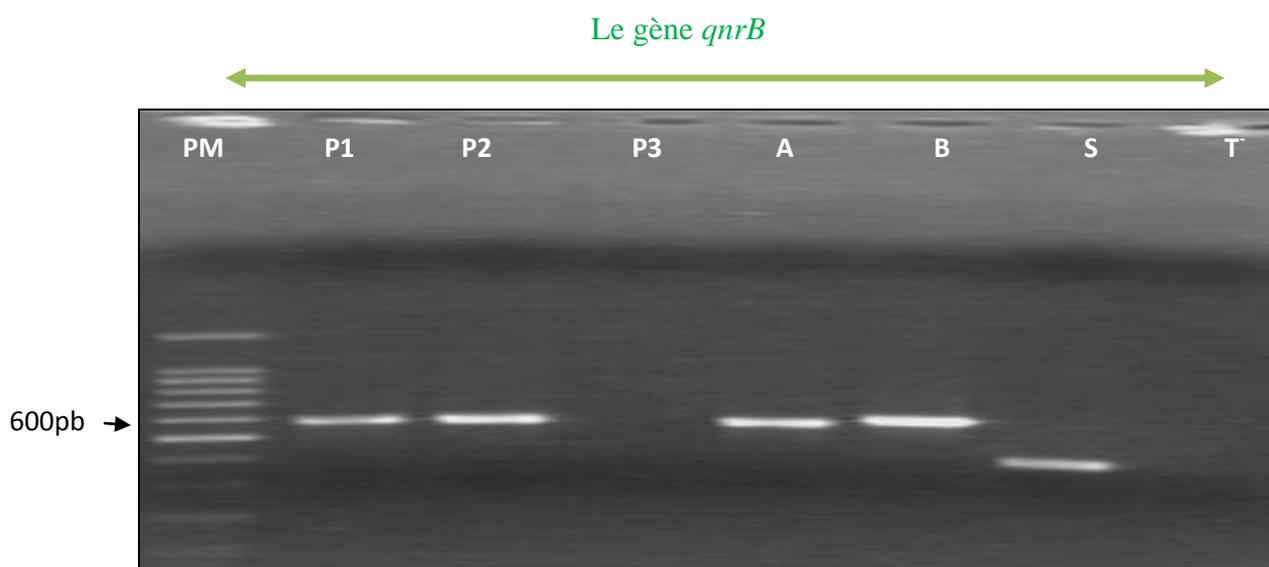


Photo 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du gène *qnrB*

MP: marqueur de tailles de l'ADN, +: témoin positif, -: témoin négatif, **pb** : paire de bases.

6. Résistance non enzymatique

Parmi les 110 souches de *P. aeruginosa* isolées dans cette étude, 30 (27.2%) souches étaient résistantes à l'imipénème avec une CMI \geq 8-64 $\mu\text{g/ml}$. 15 souches (50%) étaient isolées du service des brûlés, 12 (4,15%) du service d'endocrinologie, une issue du service de réanimation médicale et deux à partir de deux cas ambulatoires.

Des PCR *oprD* ont été réalisées sur les 30 souches résistantes à l'imipénème.

Les produits de PCR ont été entièrement séquencés, et les séquences résultantes ont été comparées à la séquence *oprD* de la souche de référence PAO1 (GenBank accession no. CAA78448). Différents points de mutations ont été observés dans les séquences du gène *oprD* chez toutes les souches résistantes à l'imipénème même les souches produisant une métallo- β -lactamase de type VIM comparées à la séquence *oprD* de PAO1 (Photo 12).

Résultats

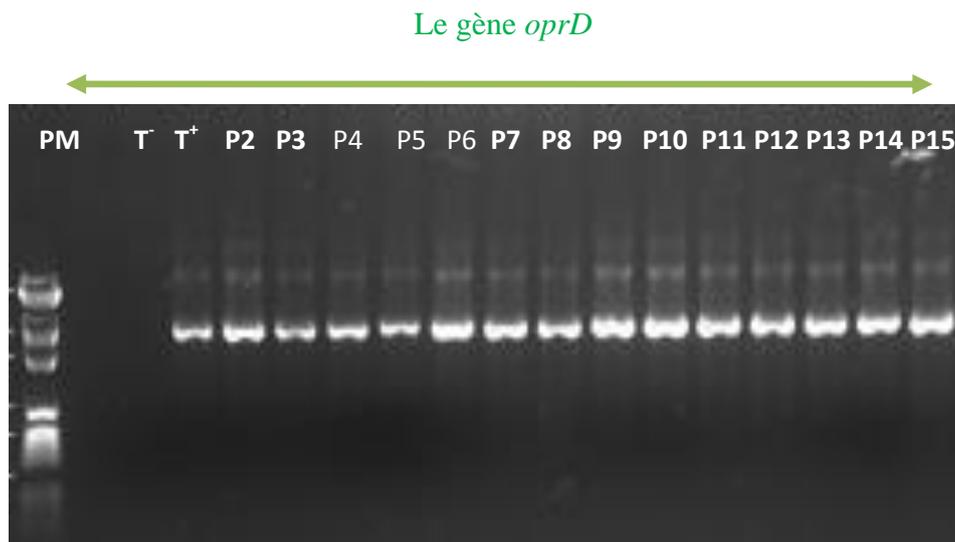


Photo 12 : Résultats de la PCR *oprD*.

Différents points de mutations ont été observés dans les séquences du gène *oprD* chez toutes les souches résistantes à l'imipénème comparées à la séquence *oprD* de PAO1. (Tableau19).

En se basant sur les points de mutation, les souches résistantes à l'imipénème peuvent être classées en cinq groupes (Tab.19). Le premier Groupe « G1 » regroupe 8 isolats du CHU Ibn Sina et présente une insertion d'un nucléotide G aux positions 40 et 137 résultant en un codon stop TAG (le nombre indique la position du premier codon stop par rapport à la position des acides aminés). Les souches isolées du groupe G3 sont toutes issues du service de brûlé.

Pour les quatre autres groupes, également des mutations par insertion à différentes positions (G2: insertion d'un C en positions 60 et 190; G3: insertion d'un G en positions 134; G4: insertion d'un nucléotide C en positions 64; G5: insertion d'un nucléotide C en positions 180) ont conduit à des codons stop prématurés et ont été retrouvés dans dix-huit souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des trois hôpitaux, incluant G2 (TGA60, 190), G3 (TAG134), G4 (TGA 64), G5 (TGA 180).

Résultats

Tableau 20 : Différentes mutations de type OprD qui se trouvent chez les souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème

| Groupe OprD | Nombre des souches | Type de Mutation de l'oprD | Position de la mutation |
|-------------|--------------------|---|-------------------------|
| G1 | 8 | Apparition « codon stop TAG » prématurée type de mutation par insertion d'un nucléotide G | TAG40,137 |
| G2 | 9 | Apparition de « codon stop TGA » prématuré Type de mutation par insertion d'un nucléotide C | TGA60,190 |
| G3 | 4 | Apparition « codon stop TAG » prématuré Type de mutation par insertion d'un nucléotide G | TAG134 |
| G4 | 5 | Apparition « codon stop TGA » prématuré Type de mutation par insertion d'un nucléotide C | TGA64 |
| G5 | 4 | Apparition « codon stop TGA » prématuré Type de mutation par insertion d'un nucléotide C | T GA180 |

7. Recherche des intégrons de classe I

Une PCR a été réalisée en utilisant des amorces CS-30 et CS-50 pour amplifier différentes tailles de fragments des intégrons de classe 1.

Ces intégrons de classe 1 (Int1) ont été détectés dans tous les isolats producteurs d'une MBL à l'exception de la souche (Pa.27), comme un amplicon de 1 kb. L'analyse de séquence de ces amplicons a révélé la présence de la cassette du gène *aadA7*. Deux isolats résistants à l'imipénème et non producteurs de MBL ont également hébergé ce type de gène cassette (Photo 13).

La caractérisation des intégrons chez 26.66 % des souches résistantes à l'imipénème (8 /30) nous a permis de détecter des cassettes *aadA*. Les cassettes *aadA* codant la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine, et au triméthoprime ont été retrouvées dans notre étude. Ces antibiotiques sont encore largement prescrits en Afrique. En effet, en Algérie, la streptomycine est toujours utilisée dans le traitement de la tuberculose; la spectinomycine est également employée dans le traitement de la gonococcie; le triméthoprime, produit-clef de l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime est encore largement utilisé dans le traitement des diarrhées.

Résultats

Intégron de classe 1

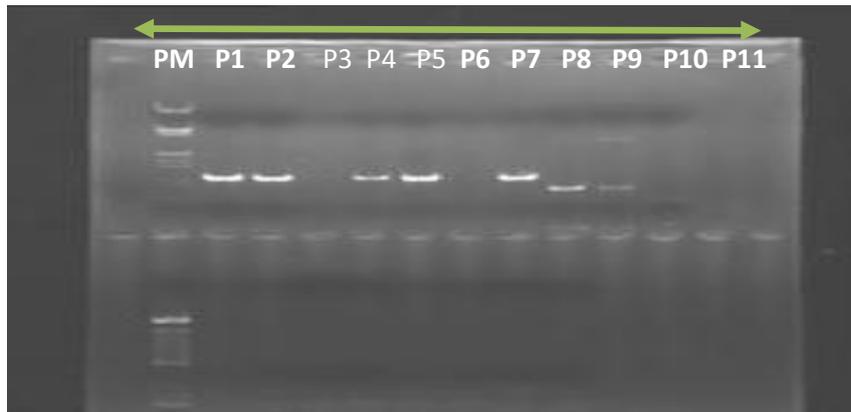


Photo 13 : Résultats de la PCR des integrons de classe1

8. Détermination phénotypique des facteurs de virulence :

8.1. Détermination des facteurs de virulence secrétés

Pour vérifier le profil de la virulence des souches isolées, une étude phénotypique de différents facteurs de virulence à été réalisée.

L'incidence de la production des facteurs de virulence par les isolats de *P. aeruginosa* testés était hétérogène selon leur taux de résistance aux antibiotiques. Soixante-dix (87%) des isolats sont capables de produire une DNase, allant de 85,71% chez les isolats résistants aux C3G à 93,02% chez les CSPA et 80% pour le groupe des CRPA. Pour la production d'hémolysine (Photo 14), 60% des isolats ont montré une activité hémolytique. Soixante-seize (76%) des isolats sont capable de produire les deux pigments spécifiques de *P.aeruginosa* avec le plus haut taux 100% et 90,47% pour le groupe des CRPA, les isolats de groupe C3G respectivement. Pour l'activité protéolytique, le taux le plus faible de cette activité a été enregistré pour les isolats sensibles (76,7%), suivis d'isolats résistants aux C3G (90,4%), les CRPA ont exprimé les taux d'activité les plus élevés. (Phot 15).

Résultats

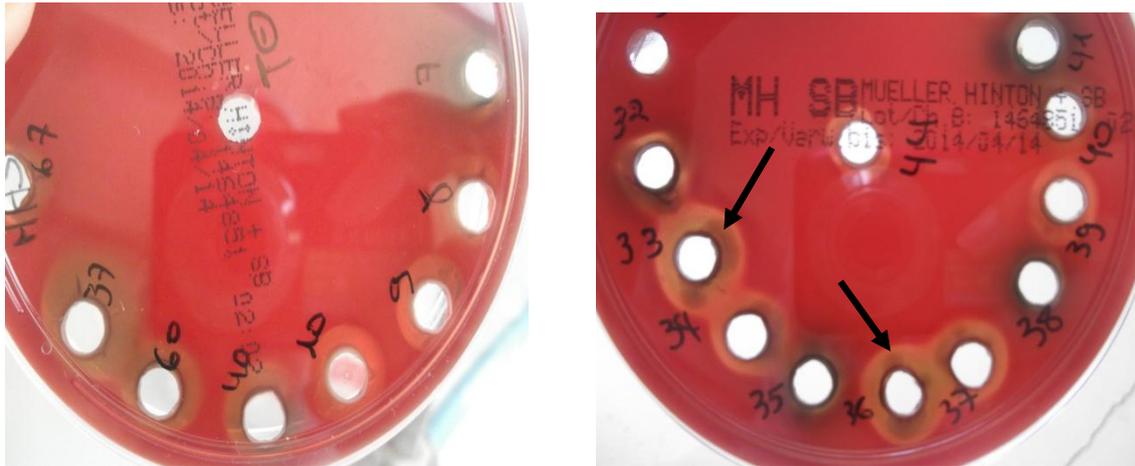


Photo 14 : Le caractère hémolytique des souches testées.

Les résultats ont démontré que CRPA et les isolats résistants aux C3G avaient des taux significativement plus élevés de facteurs de virulence par rapport aux souches sensibles.

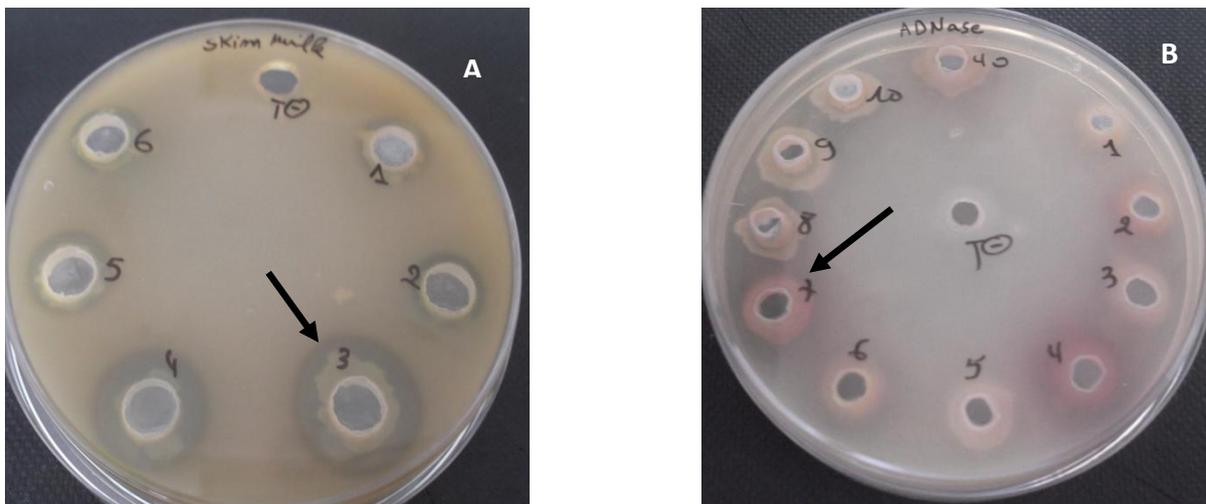


Photo 15 : **A :** Le caractère protéolytique des souches. **B :** Le caractère ADNase.

L'étude des trois types de motilité a été réalisée pour toutes les souches isolées. Les deux types de motilité *Swimming* et *swarming* ont été exprimés par tous les isolats étudiés.

Le type de motilité *twitching* a été présenté seulement par 80,6% (86,6% CRPA contre 75% CSPA) des souches testées (Photo 16). Seulement 62% de toutes les souches testées sont capables de produire les trois facteurs de virulence (DNase, protéase et hémolysine).

Résultats

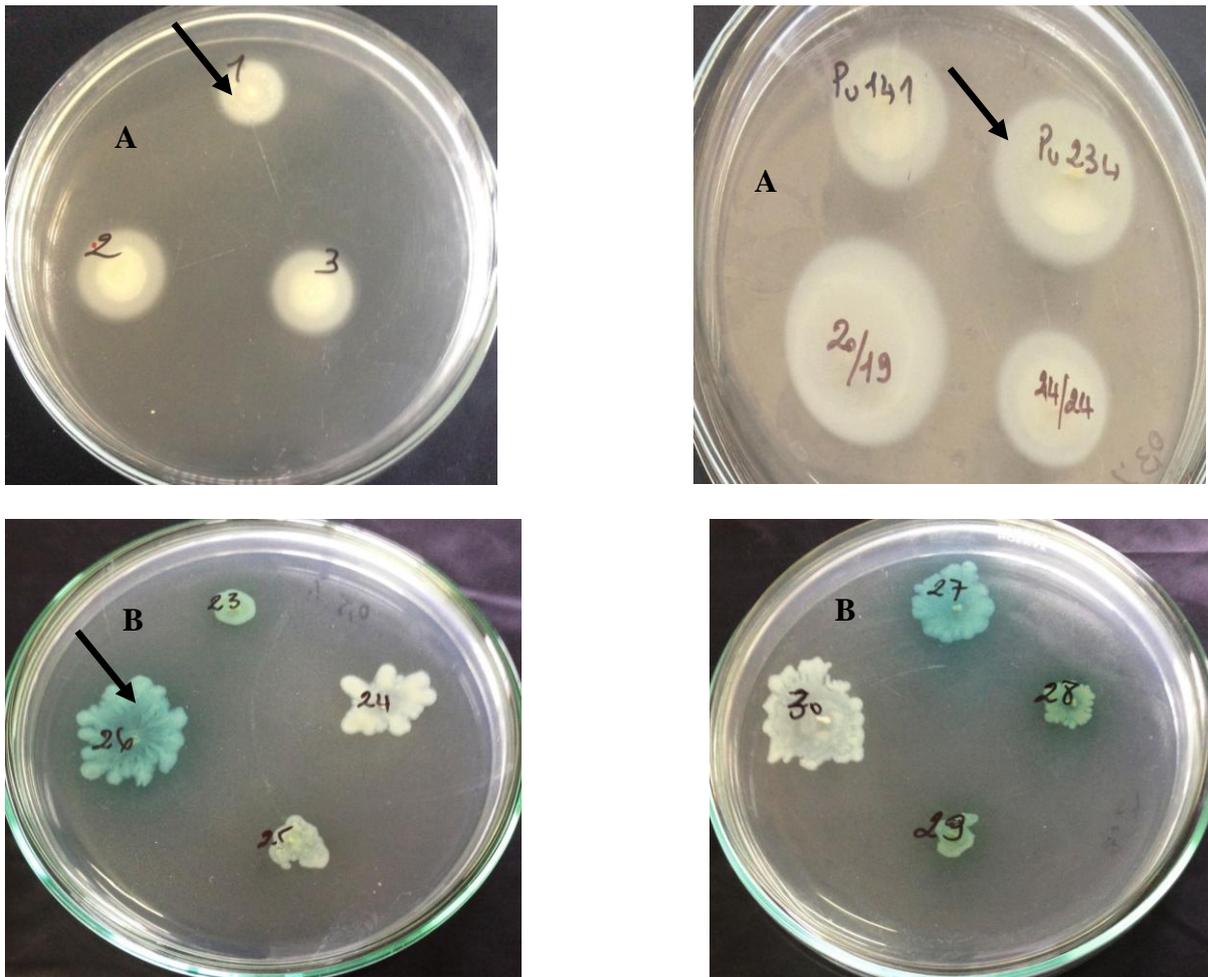


Photo 16 : A : Mobilité de type Swimming. B : Mobilité de type Swarming.

8.2. Formation de Biofilm

Vu le prolongement de la durée d'hospitalisation surtout dans les deux services les plus incriminés (l'endocrinologie et service des brûlés) et la multirésistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez tous les patients étudiés, il apparaît donc indispensable de connaître et savoir si toutes ces souches sont capables de former un biofilm pouvant être responsable des situations précitées.

La méthode quantitative de la microplaque à 96 puits a été établie pour la détection de la production de biofilm *in vitro*. (Mathur, Singhal et al. 2006).

Les 110 souches isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par la technique de la microplaque à 96 puits.

Résultats

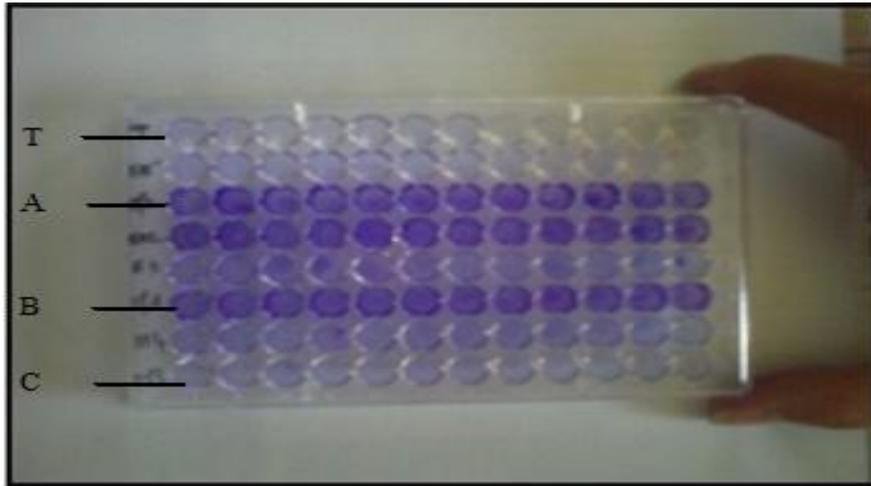


Photo 17 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode de CV.

T : témoin négatif ; **A** : souches fortement formatrice de biofilm ; **B** : formation modérée ; **C** : faiblement formatrice de biofilm.

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats de *P.aeruginosa* sont capables de former un biofilm après 24h d'incubation. Une distribution des souches selon leur capacité de formation de biofilm a été faite, nous avons divisé notre collection de souches en trois groupes: des souches fortes formatrices de biofilm, celles qui sont modérées et des souches qui sont faibles formatrices de biofilm.

Après 16h d'incubation, plus de 50% des isolats ont été fortement formateurs du biofilm, 30% étaient modérément et 25% souches ont été faibles formatrices du biofilm contrairement à l'incubation pendant 24h, on a obtenu plus de 50% des souches qui ont été faiblement formatrice de biofilm (Photo 17, Figure 11).

Résultats

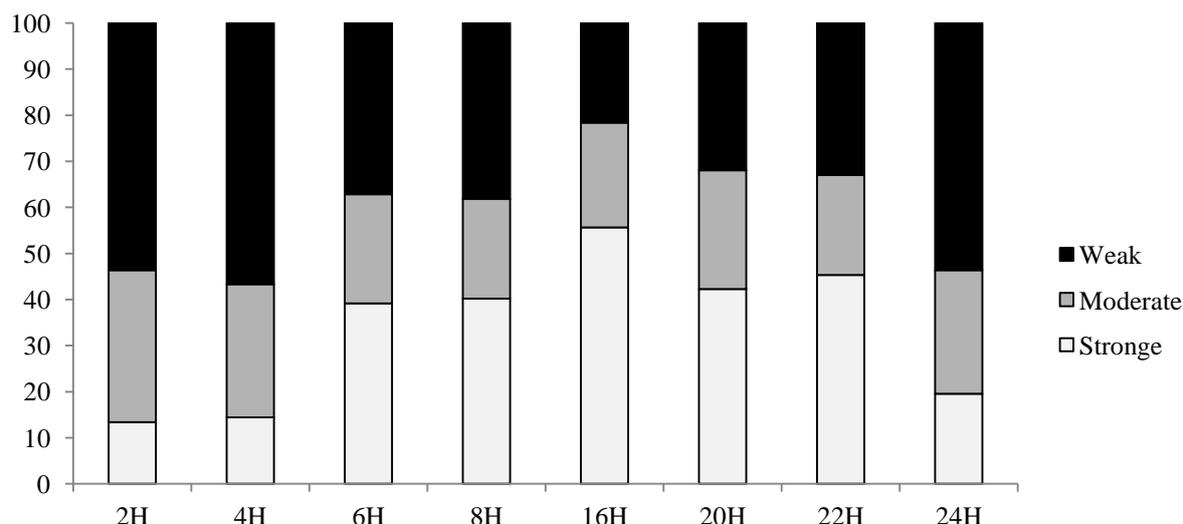


Figure 11 : Capacité des souches de *P.aeruginosa* à former un biofilm

8.3. Corrélation entre la multirésistance aux antibiotiques et la virulence phénotypiques

Une corrélation entre la capacité des souches à former un biofilm et leur résistance aux antibiotiques a également été analysée. Selon leurs phénotypes de résistance les souches sont divisées en trois groupes : les isolats qui sont résistants au carbapénème (CRPA), les souches qui sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), et les souches qui sont sensibles au carbapénème (CSPA). Pour une éventuelle corrélation entre le phénotype de résistance et la capacité de formation de biofilm, ces groupes sont classés selon leur capacité de formation de biofilm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 : Résultats de formation de biofilm par les isolats de *P.aeruginosa*

| Time in hours (h) | Biofilm-forming ability (%) | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|-------|-------|----------|---------|-------|----------|----------|-------|
| | Strong | | | Moderate | | | Weak | | |
| | CR | 3GCR | bs | CR | 3GCR | bs | CR | 3GCR | Bs |
| 2h | 13.33 | 9.52 | 20.93 | 26.67 | 38.10 | 46.51 | 60 | 52.38*** | 32.56 |
| 4h | 6.67 | 14.29 | 23.26 | 20 | 28.57 | 44.19 | 73.33*** | 57.14*** | 32.56 |
| 6h | 40 | 38.10 | 55.81 | 26.67 | 42.86** | 23.26 | 33.33 | 19.05 | 20.93 |
| 8h | 66.67 | 38.10 | 48.84 | 26.67 | 28.57 | 25.58 | 6.67 | 33.33 | 25.58 |
| 16h | 66.67 | 57.14 | 74.42 | 33.33 | 33.33 | 23.26 | 0 | 9.52 | 2.33 |
| 20h | 53.33 | 47.62 | 53.49 | 33.33 | 33.33 | 30.23 | 13.33 | 19.05 | 16.28 |
| 22h | 26.67 | 61.90 | 62.79 | 40 | 33.33* | 18.60 | 33.3 | 4.76 | 18.60 |
| 24h | 40 | 9.52 | 25.58 | 60** | 28.57 | 25.58 | 0*** | 61.90* | 48.84 |

D'après les résultats obtenus, il a été constaté que, après 8h d'incubation 66,67%, 38,10% et 48,84% des CRPA, C3G, et les CSPA respectivement possédaient une forte capacité à former un biofilm. Après 24h d'incubation tous les CRPA (100%) étaient fortement formateurs de

Résultats

biofilm en les comparants aux isolats résistants aux C3G et CSPA qui étaient à 61,90% et 48,84% faiblement formateurs de biofilm respectivement (tableau 21)

En comparant la résistance des souches de *P.aeruginosa* aux différents antibiotiques testés et leur capacité de formation de biofilm, on note que les isolats qui montrent une forte capacité de formation de biofilm ont les plus élevés taux de résistance aux différents antibiotiques testés. Egalement pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* qui ont une production modérée de biofilm ils ont une résistance plus élevée aux antibiotiques testés en les comparants aux souches qui ont une faible capacité de production de biofilm. Une corrélation significative a été notée pour la résistance au Ciprofloxacine pour le groupe des CRPA et C3G. (Figure 12).

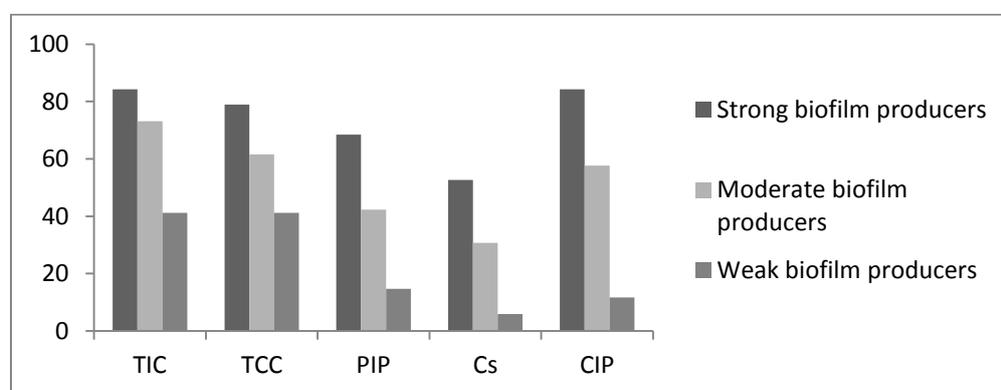


Figure 1 2 : formation de biofilm selon les phénotypes de résistance

Pour les souches issues de service des brûlés, les 30 isolats étaient capables de former un biofilm. Une comparaison entre les deux groupes de souches CRPA et CSPA a révélé que la cinétique de formation de biofilm était très hétérogène (Fig 13).

Les isolats de groupe CSPA ont présenté une forte capacité de formation de biofilm par rapport aux isolats de groupe CRPA. Pour ces derniers, le biofilm formé était modéré ou faible selon le temps d'incubation, à l'exception au temps d'incubation de 6H ou ces isolats ont présenté un taux significatif ($p=0.04$) de production d'un fort biofilm par rapport aux isolats CSPA.

Résultats

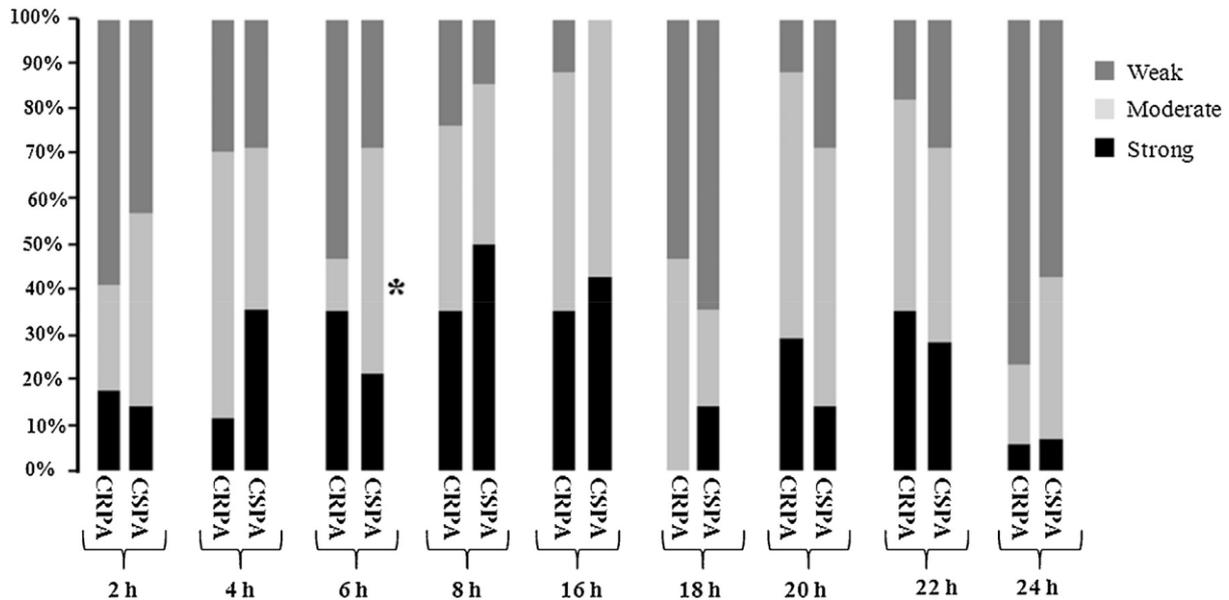


Figure 13: Comparaison entre la capacité de formation de biofilm entre les isolats de *P.aeruginosa* résistant aux carbapénèmes (CRPA) et ceux qui sont sensibles (CSPA).

La production de l'ensemble des facteurs de virulence chez l'ensemble des souches étudiées en fonction de leur aptitude à former un biofilm sont présentés dans la Fig 28.

Une incidence nettement élevée d'une activité protéolytique (100%), la production de pigments (100%), ADNase (89,7%), biofilm (100%), ont été détectés chez les isolats appartenant au groupe des CRPA. Les isolats du groupe C3G et les isolats sensibles ont également montré un taux élevé de la production de tous les facteurs de virulence testés. Les CRPA étaient plus mobiles que les autres souches étudiées expliquant leur forte capacité de formation de biofilm.

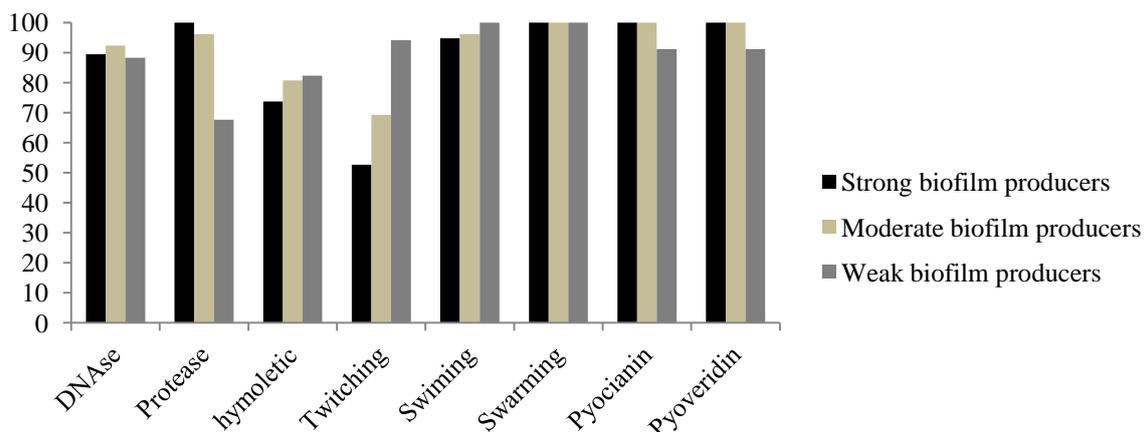


Figure 14 : caractérisation des phénotypes de virulence accordée à la formation de biofilm

Résultats

8.4. L'étude de l'impact des concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques sur la formation des biofilms

Quatre souches de *P.aeruginosa* ont été choisies pour l'étude de l'effet de deux antibiotiques (Imipénème et Ciprofloxacine) sur leur capacité de formation de biofilm.

Quatre clones ont été identifiés parmi les sept souches de *P.aeruginosa* productrices de MBL. Les souches choisies pour ce protocole sont : Pa.4 pour le clone A, Pa.12 pour clone B, Pa.10 pour clone C et Pa.27 pour clone D. En présence de sous-CMI de la ciprofloxacine, la biomasse en biofilm proportionnelle à la DO mesuré diminue lorsque la concentration en antibiotique augmente. Il y'avait une relation inverse entre la DO et la concentration de l'antibiotique (Fig 15). Cependant, lorsque la concentration en imipénème augmente la biomasse en biofilm a également augmenté (figure 15). Étant donné que pour l'imipénème, toutes les concentrations testées étaient au moins 4 fois plus faibles que le MIC, nous pouvons en déduire que les concentrations sub-inhibitrices de cet antibiotique induisant la formation de biofilm chez toutes les souches testées.

Résultats

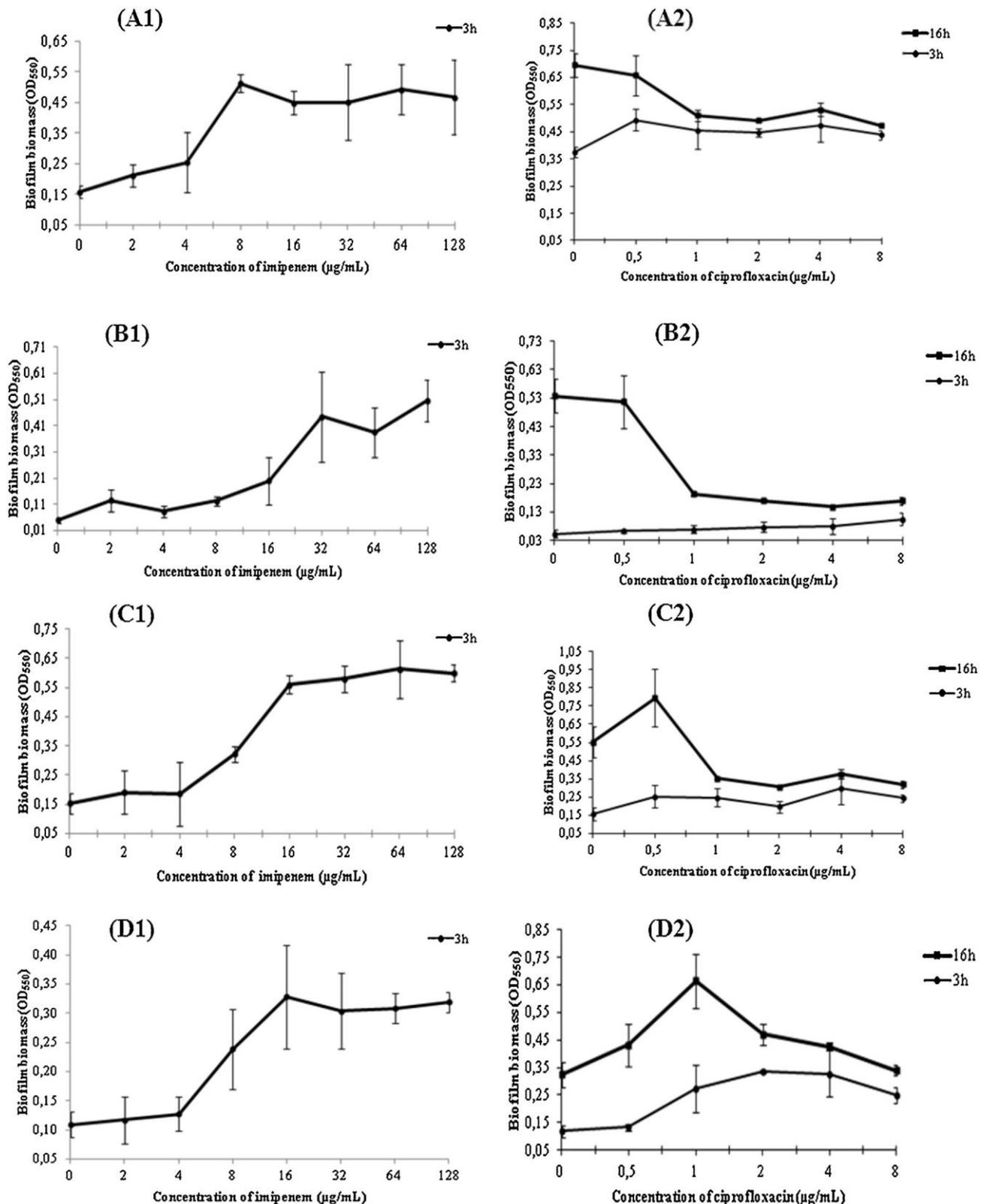


Figure 15: Quantification de la biomasse par coloration au cristal violet (DO550) en présence de concentrations accrues d'imipénème et de ciprofloxacine dans des plaques de microtitrage, après 3 et 16 heures d'incubation. (A): Pa4, (B): P.a12, (C): P.a11, (D): 27 P.a27.

Résultats

Les effets de différentes concentrations de l'imipénème et la ciprofloxacine sur la cinétique de formation de biofilm chez les quatre souches de *P. aeruginosa* sont présentés sur les figure 30 et 31 . Les concentrations sub-inhibitrices de l'imipénème induite la formation de biofilm par *P. aeruginosa* d'environ 3,5 fois, 5 fois, 5 fois respectivement pour les souches P.a27, P.a11, P.a04 et de 8 fois marqués pour la souche Pa 12 pour des concentrations allant de 256µg / ml et un temps maximal de 16h tel que déterminé par coloration au cristal violet comparant à la même souche incubé sans antibiotique.(Fig 16. 17)

En présence des concentrations sub-inhibitrices des deux antibiotiques testés, la biomasse du biofilm pour les quatre isolats augmente, lorsque la concentration de l'imipénème et la ciprofloxacine et le temps d'incubation augmente, cela a été lié par le temps nécessaire à une adhérence maximale, qui variait de 8h-22 h. Une diminution de la cinétique de formation de biofilm a été notée pour toutes les souches testées à 18h.

Résultats

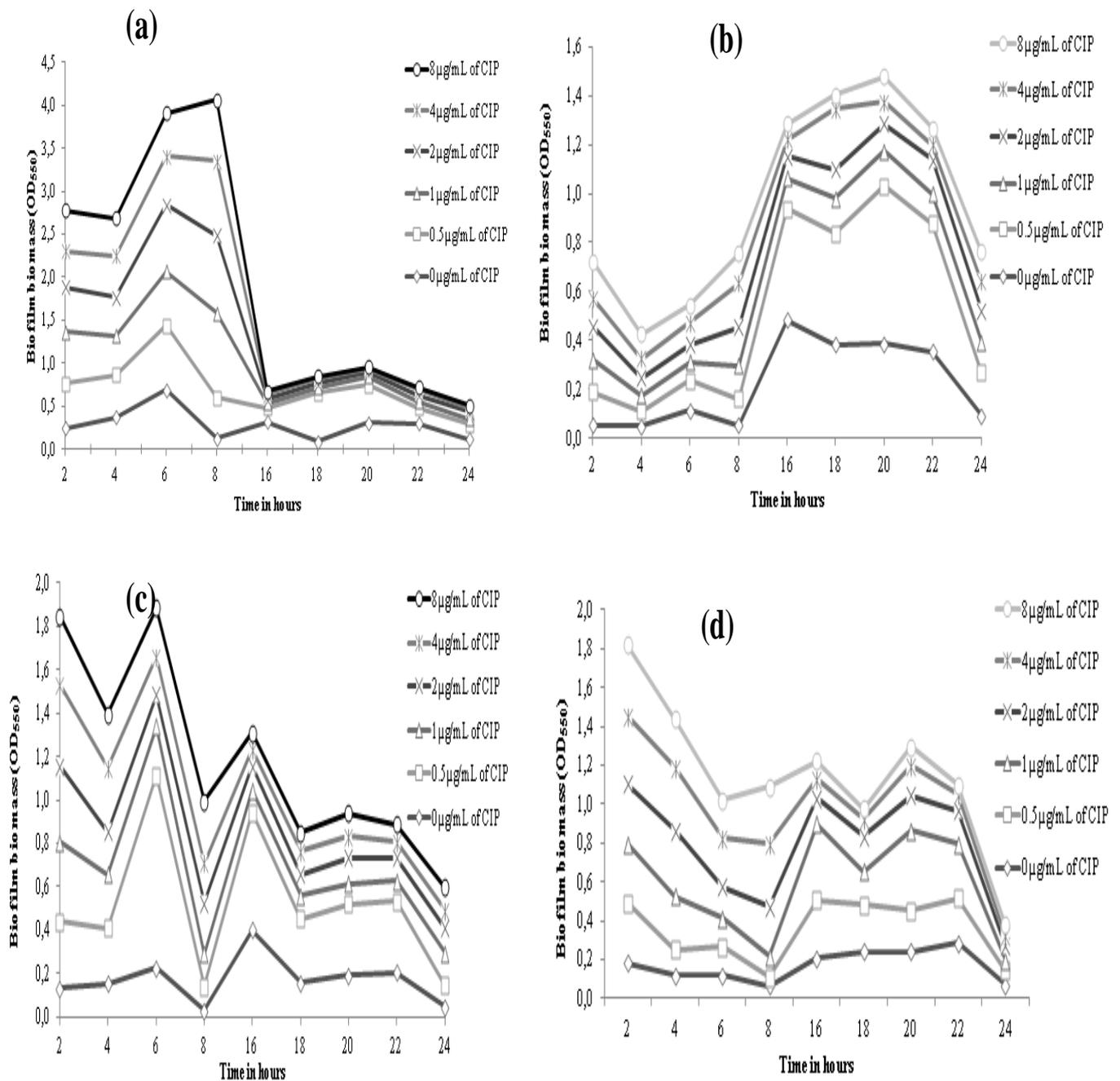


Figure 16: la cinétique d'adhésion des souches de *P. aeruginosa* cultivées en présence et en l'absence de différentes concentrations de ciprofloxacine. (a): Pa.4 isolate; (b): Pa.12 isolate; (c): Pa.10 (d): Pa.27.

Résultats

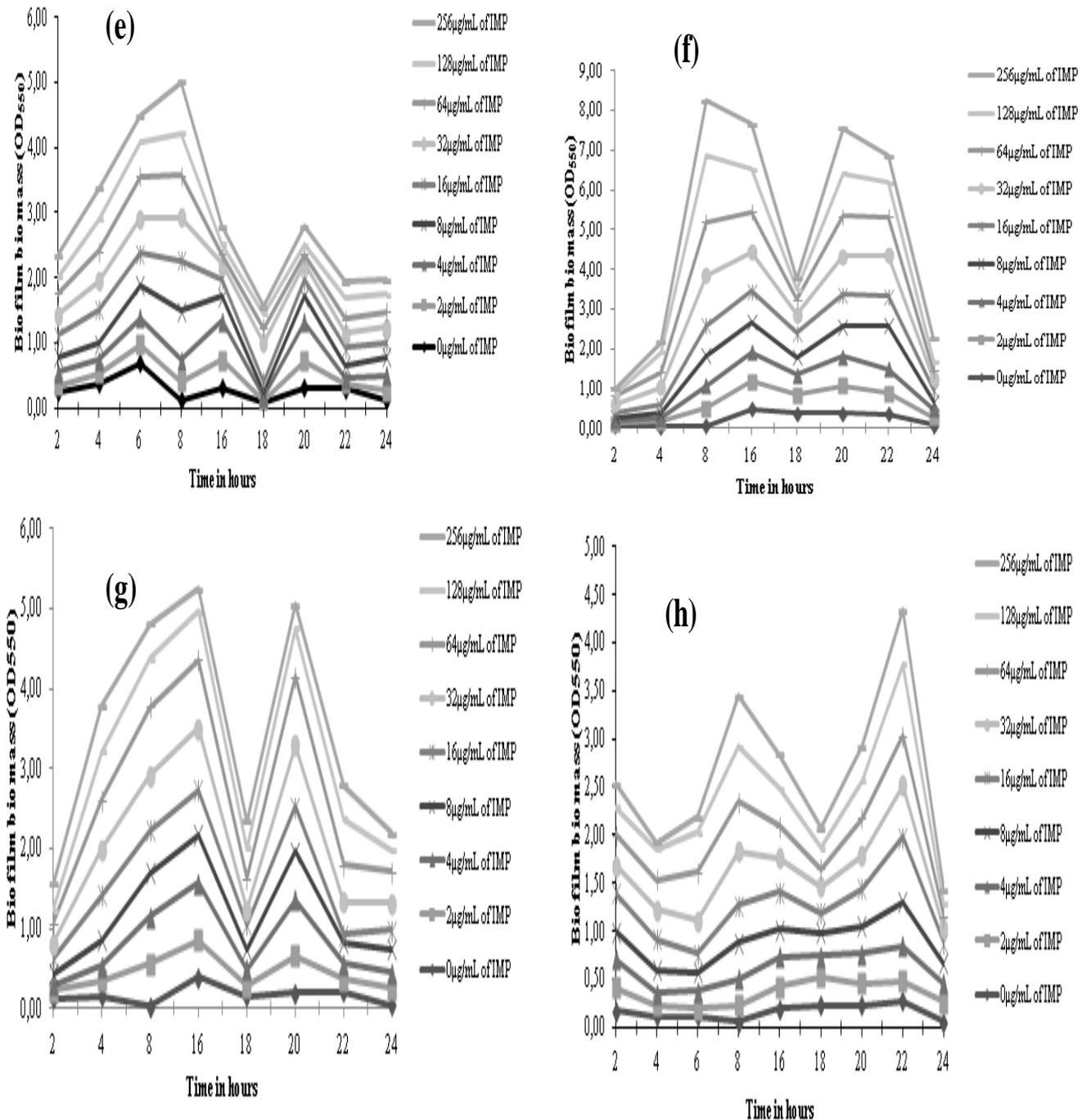


Figure 17 : la cinétique d'adhésion des souches de *P. aeruginosa* cultivées en présence et en l'absence de différentes concentrations de l'imipénème. (e): Pa.4 isolate; (f): Pa.12 isolate; (g): Pa.10 (h): Pa.27.

Résultats

Typage moléculaire

Dans le but de rechercher une éventuelle dissémination de CRPA dans les différents CHU de Annaba, une analyse par PFGE de 15 CRPA a montré que ces isolats se distribuait dans 4 géotypes différents dénommés A, B, C et D comme représenté sur la (Fig 18). L'un de ces clones a été représenté par un seul isolat (isolat P.a31, clone C). Les deux autres clones étaient représentés par six (Clone A et B) et deux (D) isolats, respectivement.

Les Clones A et B ont été isolé à partir de deux hôpitaux différents. Les isolats de Clone A sont issus de différents services et montrant une large gamme de CMI variée de 8 > 32 µg / mL), et les souches du clone B sont exclusivement issus de l'endocrinologie, Ces souches ont montré une CMI homogène (16 µg / ml).

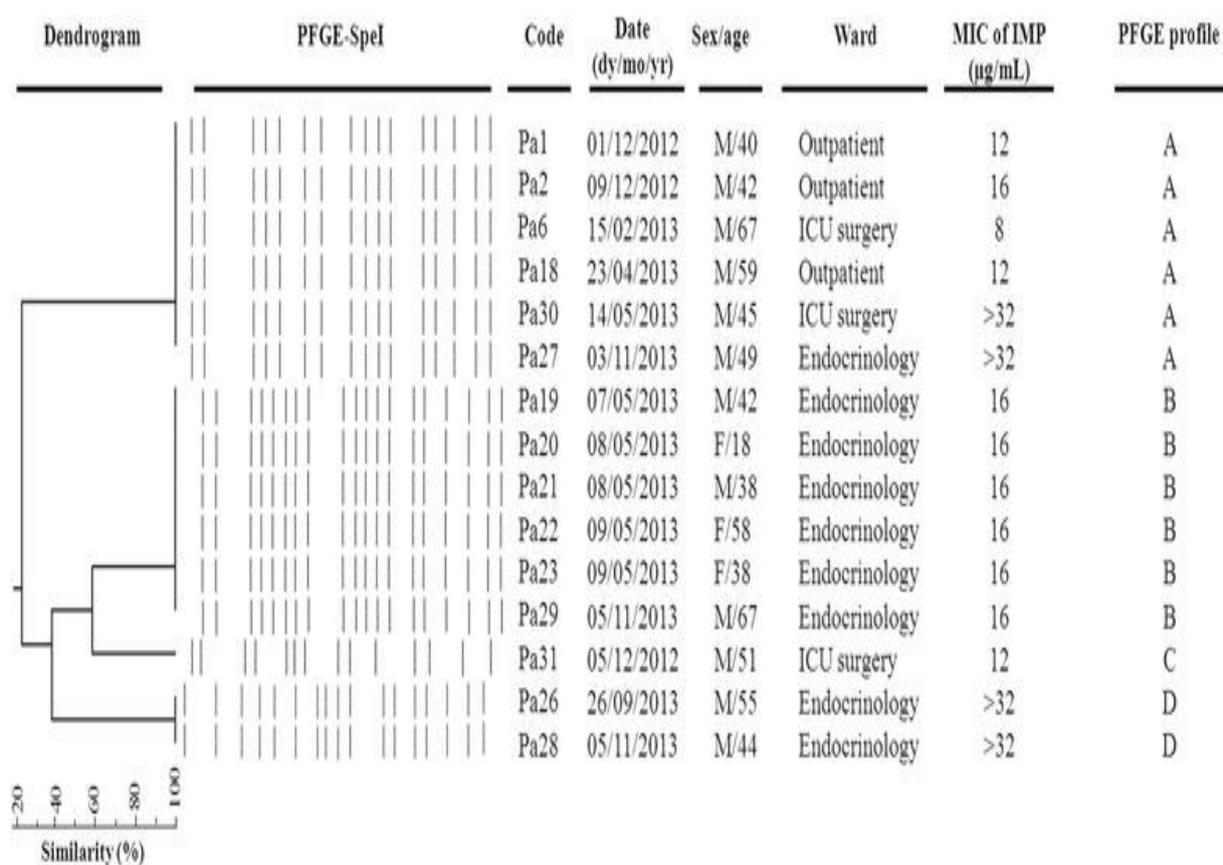


Figure 18 : Dendrogramme établi par le logiciel Dendro UPGMA, à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 15 souches de *P.aeruginosa*.

La combinaison des résultats de l'analyse géotypique par PFGE et les données cliniques issus de chaque service, démontrent l'existence de transmission des souches entre patients dans 8 cas (53,34%) c'est au niveau du service d'endocrinologie (Clone B et D) qu'on a

Résultats

assisté donc à l'émergence d'une souche MBR. En revanche, les mêmes isolats des autres clones ont été trouvés chez les patients hospitalisés dans la même salle au bout de quelques mois d'intervalle, ce qui indique que la persistance du clone au service ou à l'hôpital est toujours en vigueur.

Il est à noter que les souches productrices de MBL ont été uniquement isolées dans le service des brûlés. Ces souches (7 /30) ont été soumises également à un typage génétique par PFGE dans le but de rechercher leur éventuelle dissémination dans le service.

L'analyse par PFGE de ces 7 isolats, a révélé qu'elles appartiennent à quatre clones distincts, clones A, B, C et D correspondant à 1, 4, 1, 1 isolats, respectivement. (Figure 19). Le Clone A présenté par la souche Pa.4, a été isolé en Août 2014 d'un homme de 42 ans. Ce patient a été hospitalisé dans l'unité de soins intensifs avec un degré de brûlure au niveau de la tête et à la poitrine de 21%. Le Clone B était représenté par quatre isolats (Pa.8, Pa.9, Pa.11 et Pa.12), deux isolats (Pa.8 et Pa.9) ont été isolés le même jour en Septembre 2014 de deux patients, un homme de 19 ans, avec un degré de brûlure de 60% et une femme de 21 ans qui était hospitalisé à cause d'un abcès de greffe de peau effectuée dans le même service. Les deux autres souches (Pa.11 et Pa.12) obtenus en Octobre 2014 ont été isolées d'un homme et une femme de 60% et 98% degrés de brûlure, respectivement. L'isolat Pa.27 inclus dans le clone D a été isolé en Novembre 2014 d'un patient d'un degré de brûlure de 78%.

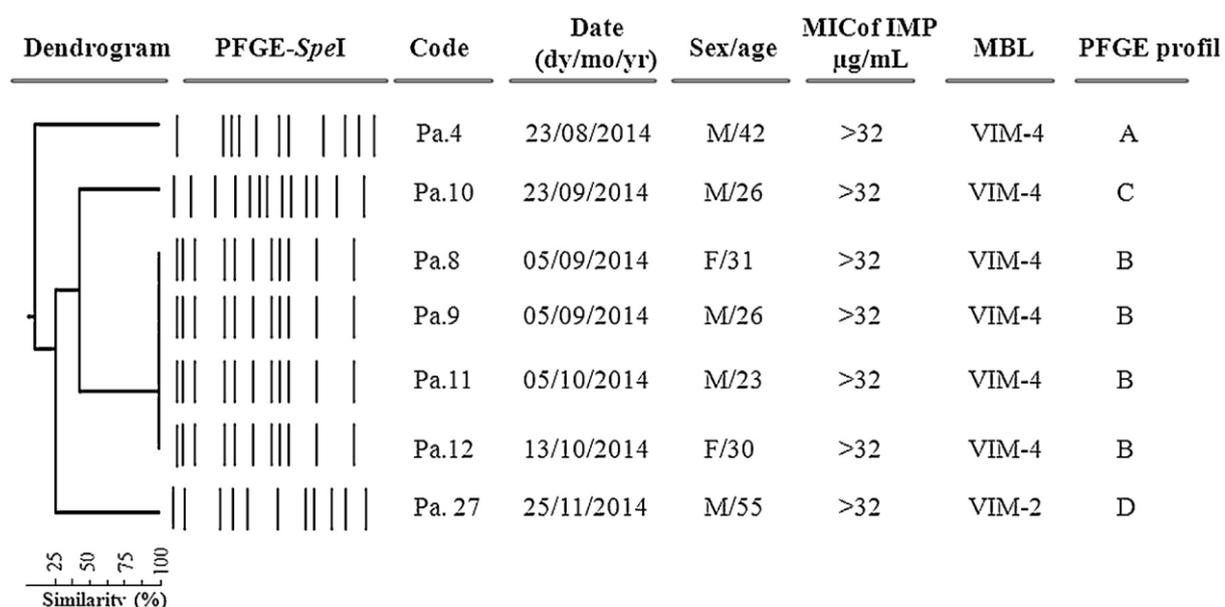


Figure 19 : Dendrogramme établi par le logiciel Dendro UPGMA, à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 15 souches de *P.aeruginosa*

Résultats

L'adhésion de *P. aeruginosa* et sa capacité de formation du biofilm sur différentes surfaces dans les hôpitaux sont considérées comme la principale source de l'infection et la diffusion de souches épidémiques.



DISCUSSION

Discussion

Provenance des souches

Depuis quelques décennies, les bactéries du genre *Pseudomonas* ont été impliquées dans de nombreuses maladies infectieuses. Bien qu'elles soient principalement associées aux infections nosocomiales, elles ont également été impliquées dans des cas d'infections acquises communautaires. *Pseudomonas aeruginosa* représente aujourd'hui un modèle d'adaptation particulièrement efficace en termes d'antibiorésistance, sa capacité à survivre de façon prolongée en milieu hospitalier associée à l'émergence de résistances potentialise sa capacité de propagation nosocomiale (Touati, diene et al, 2013).

De ce fait, nous avons étudié un panel de 110 souches de *P.aeruginosa* isolées aux trois centres hôpitalo-universitaires au niveau de la wilaya d'Annaba. Cette étude réalisée entre 2013 et 2015 a montré la fréquence d'isolement la plus élevée pour l'espèce *P.aeruginosa* par rapport aux autres BGN isolés des mêmes prélèvements.

Les souches de *P.aeruginosa* ont été isolées dans (48%) des cas à partir du service de l'endocrinologie, dont les prélèvements concernés proviennent essentiellement des prélèvements de pus. Ce service d'endocrinologie regroupe généralement des sujets âgés diabétiques qui sont prédisposés à développer des infections des plaies et des blessures. Le facteur de risque principal dans ce service est le diabète avec une fréquence élevée de lésions de pied diabétique qui constitue une complication grave avec un risque d'amputation et de mortalité après amputation.

Une étude récente faite au niveau du CHU d'Annaba qui a porté sur la caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des pieds diabétiques a montré que l'espèce *P.aeruginosa* occupe la troisième place avec une fréquence de 47% dans les infections du pied diabétique après *S. aureus* (85%) et *K. pneumoniae* (83%) (Djahmi, Messad et al. 2013). En outre, la catégorie de patients hospitalisés dans cette structure hospitalière est représentée par une population âgée et prédisposée. En plus d'âge et l'incompétence immunitaire de cette population, plusieurs facteurs de risque ont été déterminés dans cette étude, notamment l'infection polymicrobienne, surtout en présence de *S.aureus* (p=0.03), l'antibiothérapie à des spectre large, la sévérité de la pathologie sous-jacente, la durée prolongée du séjour, l'utilisation préalable des antibiotiques, la durée du cathétérisme des voies urinaires, les mauvaises conditions d'hygiène et la fréquence de la transmission manu-portée par le personnel soignant.

Discussion

Les résultats obtenus dans notre étude concordent avec les données d'une étude rapportée en Pakistan sur les infections nosocomiales à *P.aeruginosa* qui ont révélé un taux de 40% de *P.aeruginosa* dans le service d'endocrinologie, classé en deuxième position après le *staphylocoque doré* (Sabir, Alvi et al. 2014).

En Tunisie, une étude rétrospective à-propos de 95 cas de malades hospitalisés dans le service d'endocrinologie du CHU Fattouma Bourguiba au cours de la période allant de janvier 2006 à mars 2011, a montré une fréquence d'isolement de cette bactérie de 15.1% (Marmouch, Aouam et al. 2014).

Au Kuwait, les données d'une étude rétrospective du profil microbiologique des infections du pied diabétique recueillies de Juin 2007 à Juillet de 2008 ont montrées que *P.aeruginosa* été classé en deuxième position après les entérobactéries (28.5%) avec une prévalence de 17.4% (Al Benwan, Al Mulla et al. 2012).

En inde, *P.aeruginosa* était responsable de 24.7% d'infections nosocomiales en service d'endocrinologie. Sur 162 prélèvements, 40 souches ont été isolées des patients présentaient différents degrés de lésions de pieds diabétiques. Sur les 40 isolats de *P. aeruginosa*, 22 (55%) isolats ont été trouvés résistants aux carbapénèmes et 18 (81,1%) se sont révélés être des producteurs de MBL (Zubair, Malik et al. 2011).

En Cote d'ivoire à partir de 114 cas de prélèvements cutanés des lésions des pieds diabétiques, 16.7% sont avérés positifs pour *P.aeruginosa* (Lokrou, Angnès Memel et al. 2013).

Le second service le plus touché par les infections à *P.aeruginosa* dans cette étude était le service des brûlés. Dans la majorité des cas, l'infection à *P. aeruginosa* est opportuniste elle survient chez les patients fragilisés (opéré récent, patient sous assistance respiratoire...) (Talon 1999; Bertrand, Blasco et al. 2003; Floret, Bertrand et al. 2009).

Les brûlés graves sont une exception au sein de cette catégorie de patients: par la disparition du film protecteur que constitue la peau, la dénutrition rapide est responsable d'immunodéficience majeure, environnement spécialisé englobant de nombreux réservoirs pathogènes potentiels (Chaibdraa, Medjellekh et al. 2008), et ceci concorde avec les résultats obtenus dans la présente étude, en effet un taux d'isolement de (62%) a été trouvé dans ce service. Ces résultats obtenus restent inférieurs à ceux rapportés dans une étude effectuée entre Juin 2003 à Décembre 2005 dans le même service au niveau de CHU Ibn Sina,

Discussion

(Annaba) qui a montré que le pyocyanique est isolé dans 89% des cas après la première semaine d'hospitalisation. Sa progression entre la première semaine et au-delà de la troisième semaine est multipliée par 4.8 (Chaibdraa, Medjellekh et al. 2008).

Dans notre étude, la fréquence de prélèvements de pus par rapport aux autres produits pathologiques est dominante avec une fréquence de 78%. Ceci concorde avec d'autres rapports de la littérature. Selon l'étude menée par *Chaibdraa et al* le pyocyanique se situe après le *staphylocoque* pour les prélèvements précoces et repasse en tête après un séjour supérieur à une semaine pour les prélèvements cutanés avec une fréquence de 87.5% (Chaibdraa, Medjellekh et al. 2008).

Plusieurs travaux similaires ont montré des prévalences d'isolement de *P.aeruginosa* beaucoup plus inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude,

Au Maroc, une étude rétrospective portant sur 84 patients hospitalisés au sein du service de réanimation des brûlés de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat, sur une période de 3 ans, a montré que *P.aeruginosa* est apparu en seconde position après le *Staphylocoque* (33.3%) avec 21 cas d'infections nosocomiales (19,6%) dont le site cutané était majoritaire, avec 87 cas (81,3%) (Siah, Belefqih et al. 2009).

Une étude récente dans le même service a également montré que *P.aeruginosa* se situe en deuxième position après le *Staphylocoque* avec une prévalence de (15.1%).(Essayagh, Essayagh et al. 2014).

En Tunisie, *P. aeruginosa* (15 %) était la seconde bactérie la plus souvent retrouvée, après *Staphylococcus aureus* (20%), Ces souches provenaient essentiellement de prélèvements cutanés (83,4%) (Zoghlami, Kanzari et al. 2012).

En Iran, 114 souches de *P.aeruginosa* collectées pendant une année étaient responsables d'infection nosocomiale essentiellement cutanée (75%) dont le pyocyanique est le plus fréquemment isolé (37,5%), suivi par *Staphylococcus aureus* (20,2%), et *Acinetobacter baumannii* (10,4%) (Ekrami and Kalantar 2007).

Enfin, une étude rétrospective rapportée en Inde sur une période de 5 ans (Juin 1997-mai 2002) affirme que ce pathogène est issu dans 96% des prélèvements cutanés de pus et il représente la bactérie majoritaire avec un pourcentage de (59%) suivi par *S.aureus* (17,9%) (Agnihotri, Gupta et al. 2004).

Discussion

Répartition des souches selon le sexe des patients

Concernant le sexe des patients, nous avons constaté que le sexe masculin est prédominant pour toutes les souches. Au total, 110 patients touchés par *P.aeruginosa* ont été concernés par cette étude, 48 femmes et 62 hommes le sexe ratio étant 0.77. Cette différence dans la présente étude reste statistiquement non significative. Ce rapport est en corrélation avec les données de la littérature qui présentent une prédominance masculine avec des valeurs allant de 1,44 à 2,55 (Anlatici, Ozerdem et al. 2002; Essayagh, Essayagh et al. 2014; Elmjendel, Mribah et al. 2015). Une autre étude rétrospective sur les infections nosocomiales des *P.aeruginosa* rapportant une série rétrospective de 51 pieds diabétiques colligés au service de chirurgie orthopédique de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed-V de Rabat a également montrée la prédominance du sexe masculin dans plus de 82% des cas (Bah, Bassinga et al. 2015). Ce rapport s'explique par une tendance des hommes à adopter des comportements à risque et à exercer des professions exposées.

Répartition des souches selon l'âge des patients

L'âge moyen de notre population est de 47 ans. Cette valeur est proche des données rencontrées dans la littérature et qui fluctuent entre 15,8 et 48,2 ans (Anlatici, Ozerdem et al. 2002; Maghsoudi, Pourzand et al. 2005; Karimi, Motevalian et al. 2014).

Les âges extrêmes de la vie présentent classiquement un pronostic défavorable avec une mention particulière chez les sujets âgés, chez qui une brûlure même modeste peut mettre en cause le pronostic vital, car la capacité de cicatrisation et la défense de l'organisme contre les infections sont réduites. En effet, chez ces sujets, la peau s'amincit et les cellules germinatives deviennent de plus en plus superficielles donc plus faciles à être détruites; la cicatrisation est en outre moins efficace du fait de la diminution de la microcirculation cutanée.

L'étude menée par *Lionelli*, portant sur l'évaluation de 201 brûlés, a montré que l'âge supérieur à 75 ans, et la présence d'une infection sont des facteurs pronostiques de mortalité (Lionelli, Pickus et al. 2005).

Discussion

Résistance aux antibiotiques

En Algérie peu de données actualisées permettant de décrire l'évolution du niveau de la résistance des *P.aeruginosa* aux antibiotiques afin d'actualiser les mesures prophylactiques et thérapeutiques.

P.aeruginosa est résistant naturellement à un grand nombre d'antibiotiques. Les fluoroquinolones, les aminosides, quelques β -lactamines dont les carbapénèmes, et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. Les résistances acquises contre ces quelques antibiotiques sont fréquentes, rendant la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* de plus en plus compliquée.

Phénotype de résistance aux β -lactamines

L'évolution rapide de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries est actuellement un phénomène inquiétant dans les pays en voie de développement, en particulier dans certains pays d'Afrique, l'Algérie est un pays en Afrique du Nord, où les données récentes de la résistance aux antibiotiques indiquent une situation préoccupante. En effet, les 10 dernières années ont été marquées par l'émergence et la propagation de nouveaux gènes de résistance, en particulier au niveau des hôpitaux du nord algérien (Drissi, Poirel et al. ; Drissi, Ahmed et al. 2008; Baba Ahmed-Kazi Tani, Decre et al. 2013; Mesli, Berrazeg et al. 2013; Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance élevé de *P. aeruginosa* aux différentes classes d'antibiotiques testées ainsi que la diversité de phénotypes de résistance au niveau du service des brûlés par rapport à ceux observés au niveau des autres services. Ceci peut être dû au nombre plus important de lits dans ce service par rapport aux autres services, sans oublier qu'il accueille beaucoup de patients provenant de différentes villes de l'est algérien. Les souches isolées au niveau du service des brûlés présentaient des taux de résistance très élevés aux β -lactamines. Les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime (50% et 96.7% respectivement) sont beaucoup plus élevés par rapport à ceux rapportés dans le dernier rapport du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques au CHU d'Annaba (<http://www.sante.dz/aarn/rapports.htm>) où les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime étaient de 8.73% (9/103) et 35.92% (23/103) respectivement. Ces résultats sont assez comparables à l'étude réalisée sur la résistance aux antibiotiques au CHU d'Annaba dans le service de réanimation qui a révélé qu'un taux de (50%) sur l'ensemble des souches

Discussion

de *P.aeruginosa* isolées, étaient résistantes à l'imipénème et seulement (17.6%) étaient résistantes à la céftazidime (Touati, Diene et al. 2013).

Si l'on considère l'ensemble des souches isolées dans notre étude, les taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime (29% et 58.1 % respectivement) sont très élevés par rapport à ceux habituellement observés dans les pays européens, qui en 2012 étaient de 17,1% à l'imipénème et de 13,5% à la ceftazidime (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>).

A l'échelle nationale les résultats de la présente étude sont également supérieurs à ceux rapportés dans le 15^{ème} rapport du réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques (<http://www.sante.dz/aarn/rapports.htm>) où le taux de résistance à l'imipénème et la ceftazidime était de 15.41% et 15.40% respectivement.

Au Nord Ouest algérien, plusieurs études ont été réalisées, des taux de résistance différents ont été rapportés, Seul *Drissi.M et al* ont rapporté le taux de résistance le plus élevé pour la classe des carbapénèmes ou il a noté un pourcentage de 35% dans une étude menée durant la période allant de 2008/2009 (Drissi, Ahmed et al. 2008).

Sefraoui et al dans une étude récente menée en 2013/2014 a montré que sur l'ensemble de 261 souches de *P.aeruginosa* isolées, 18% ont été résistantes à l'imipénème et 14.7% étaient résistantes à la ceftazidime (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

En Tunisie, *Hammami S et ses collaborateurs* ont montré sur une étude de *P. aeruginosa* de 2002 à 2006 au niveau de l'hôpital Charles Nicolas, une résistance à l'imipénème de 43,9% (Hammami, Gautier et al. 2010).

Au Kenya, entre 2006/2007, une étude de 18 mois, sur des souches de *P. aeruginosa*, montre une résistance de 13,7% à l'imipénème avec des CMI hautement élevée MICS > 32 mg/l.

Phénotype de résistance aux aminosides

Concernant la résistance aux aminosides, les isolats de *P.aeruginosa* isolés durant la première période allant de 2012 à 2013 ont présenté une résistance assez remarquable pour les aminosides; (30%) vis-à-vis de la tobramycine, (21.75%) vis-à-vis de la gentamicine, et 7% vis-à-vis de l'amikacine, ce taux de résistance trouvé se rapproche de celui trouvé en nord ouest algérien : Gentamicine (34,2%), Tobramycine (30,4%) et Amikacine (7,6%).(Sefraoui, Berrazeg et al. 2014). Ces résultats restent supérieurs à ceux rapportés par *Touati et all* dans étude

Discussion

rétrospective dans le service de réanimation dans un CHU à Annaba avec un pourcentage de 30% vis-à-vis de la gentamicine et une sensibilité total de l'ensemble des souches pour l'amikacine (Touati, Diene et al 2013).

Les niveaux de résistance étaient nettement plus élevés au niveau du service des brûlés durant la période allant de 2014 jusqu'à 2015 ; gentamicine de 80.6% suivi par 48.4% pour l'amikacine et 60% pour la tobramycine. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude rétrospective rapportée sur sept cent trente-huit souches non répétitives de *P. aeruginosa* collectées en octobre 1999 dans 15 centres hospitalo-universitaires en France (Cavallo, Leblanc et al. 2001).

Selon le rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN en 2015, sur l'ensemble des souches de *P.aeruginosa* isolés à l'échelle nationale, la résistance à la gentamicine, à l'amikacine et à la tobramycine étaient de 16.3%, 11.6%, 12.1% respectivement.

Phénotype de résistance aux fluoroquinolones

Pour la résistance aux quinolones, on note une résistance assez remarqué pour la ciprofloxacine avec un taux de 43.7% pour les isolats issus durant la période allant de 2012 à 2013. Pour les souches issues du service des brûlés, les taux de résistance obtenus sont inférieurs, un taux de résistance de 22.5% a été observé pour la ciprofloxacine et la lévofloxacine respectivement. Ce taux de résistance reste légèrement inférieur à celui rapporté en Tunisie avec un taux de 33.5% (Abdallah, Noomen et al. 2008; Elhani, Elhani et al. 2012) et supérieur à celui rapporté a l'échelle nationale, *Touati et al*, *Sefraoui et all*, *Drissi et al* ont montré des taux de résistance à la ciprofloxacine de 20% , 19.4%, 10% respectivement (Touati, Diene et al.2013 ; Drissi, Ahmed et al. 2008; Sefraoui, Berrazeg et al. 2014). Selon le rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN en 2015, sur l'ensemble des souches de *P.aeruginosa* isolées la résistance à la ciprofloxacine était de 14.7%.

Durant, ces dernières décennies, les souches de *P. aeruginosa* résistent à un nombre croissant d'antibiotiques et d'une manière de plus en plus fréquente. L'imipénème est alors considéré comme un antibiotique de première intention, dans les infections nosocomiales car c'est l'antibiotique le plus efficace.

Discussion

Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à ce problème de résistance (Meradji, Barguigua et al. 2016).

Devant, ces bactéries multirésistantes, il nous est apparu dans notre travail, essentiel de rechercher les supports génétiques et le type de résistance.

Profil moléculaire de résistance aux β -lactamines

La résistance enzymatique liée à la production d'une β -lactamase acquise de type pénicillinase PSE-1 n'a été détectée que chez une seule souche isolée au niveau du service des brûlés bien que ce gène a été rapporté comme épidémique dans plusieurs études.

Dans cette étude, trente souches (29%) isolées à partir de trois différents hôpitaux étaient résistantes à l'imipénème, soit quinze souches (50%) isolées du service des brûlés dont sept souches (41.1%) productrices de MBL de type VIM. VIM-2 était produit par une seule souche (14.3%). Dans cette étude, nous avons signalé, pour la première fois, la présence du gène VIM-4 métallo- β -lactamase de la classe B selon la classification de Ambler. Ce gène est produit par six souches (85.7%) de *P. aeruginosa* isolées à partir des prélèvements de pus issus du service des brûlés au CHU de Annaba- Algérie.

De nombreuses études ont rapporté la prédominance du gène VIM-2 chez les souches de *P. aeruginosa* dans le bassin méditerranéen (Cornaglia, Giamarellou et al. 2011), tandis qu'en Afrique du nord, la présence de VIM-2 n'a été rapportée que récemment en Tunisie (Hammami, Gautier et al. 2010; Hammami, Boutiba-Ben Boubaker et al. 2011).

Plusieurs épidémies à *P. aeruginosa* producteur de VIM-2 ont été rapportées en Tunisie notamment à l'Hôpital Sahloul à Sousse et à l'hôpital Charles Nicolle à Tunis (Ktari, Mnif et al. 2011). Les souches de *P. aeruginosa* productrices de cette MBL ont été décrites aussi dans deux hôpitaux à Sfax. L'émergence de *P. aeruginosa* producteur de VIM-2 dans différentes régions de la Tunisie est particulièrement inquiétante.

Au Maroc, une étude rapporte que 27% des souches de *P. aeruginosa* étaient productrices de MBLs sans spécifier leur type (Ait el kadi, Aghrouch et al. 2006). Une autre étude récente affirme que sur 123 souches cliniques et de l'environnement isolée dans un centre des brûlés à

Discussion

Fès a montré que 33 des souches ont été résistantes à l'imipénème et seulement (6.6%) soit deux isolats ont présenté le gène VIM-2 (Maroui, Barguigua et al. 2016).

A l'échelle nationale VIM-19 a été la première carbapénémase identifiée en Algérie à partir de cinq isolats cliniques d'entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Providencia stuartii*) (Robin, Aggoune-Khinache et al. 2010). Récemment, Touati et al. ont décrit la première diffusion de souches de *P. aeruginosa* productrices de MBL VIM-2 dans 14 isolats cliniques au niveau de CHU à Annaba, (Touati, Diene et al 2013), au nord-est algérien Sefraoui et ses collaborateurs ont présenté la deuxième description de *P. aeruginosa* productrices de VIM-2 en Algérie au cours de la même année (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

Dans cette étude, nous avons signalé, pour la première fois, la présence du gène VIM-4 au sein de nos souches, ces résultats obtenus peuvent indiquer la situation préoccupante de l'émergence des bactéries cliniques multirésistantes produisant des MBLs dans le nord d'Afrique.

Le gène VIM-4 a été décrit pour la première fois dans des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* isolée de l'hôpital universitaire de Thessalie (Larissa, Grèce), au cours des deux ans qui en suivait l'isolation de ces souches, une épidémie a été déclarée dans cette institution (Pournaras, Tsakris et al. 2002; Pournaras, Maniati et al. 2003). Comme les gènes *blaVIM* sont insérés dans des cassettes de gènes dans des intégrons de classe 1 ils peuvent diffuser rapidement.

Les bactéries produisant VIM-4 ont été signalées dans plusieurs régions dans le monde (Grèce, Italie (Luzzaro, Docquier et al. 2004), Suède (Giske, Rylander et al. 2003), la Hongrie (Libisch, Giske et al. 2008), Pologne (Patzner, Toleman et al. 2004), Belgique (Bogaerts, Huang et al. 2008), la Tunisie (Ktari, Arlet et al. 2006), les États-Unis et en Australie (Peleg, Bell et al. 2006) et appartiennent à des espèces différentes (*Pseudomonas aeruginosa* (Giske, Rylander et al. 2003), *Pseudomonas putida* (Bogaerts, Huang et al. 2008), *Aeromonas spp.*, *Enterobacter cloacae* (Luzzaro, Docquier et al. 2004), *Klebsiella pneumoniae* (Luzzaro, Docquier et al. 2004) et *Acinetobacter baumannii* (Giannouli, Tomasone et al. 2009). Libisch et al. ont signalé une épidémie de ces souches de *Pseudomonas aeruginosa* produisant le gène VIM-4 dans sept hôpitaux en Hongrie entre Octobre 2003 et Novembre de 2005 (Libisch, Muzslay et al. 2006).

Récemment en Egypte, une étude a rapporté la présence de ce gène au sein de souches cliniques d'*E. cloacae* (Dimude and Amyes 2013).

Discussion

Profil moléculaire de la résistance aux aminosides

Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les β -lactamines à très large spectre (Baba Ahmed-Kazi Tani and Arlet 2014). Parmi les enzymes modificateurs d'aminoglycosides (AMEs), Cinq souches de CRPA hébergeaient le gène *aac(3')-II*, qui confère la résistance à la gentamicine, la nétilmicine et la tobramycine.

Ce gène a été trouvée dans une large variété de genres, chez *E. coli*, *Alcaligenes faecalis*, *S. marscescens* et *P. aeruginosa* (Dubois, Arpin et al.2006; Oteo, Navarro et al. 2006).

Dans une étude récente sur des souches cliniques d'entérobactéries isolées dans un hôpital tunisien, les auteurs ont suggéré que l'enzyme identifiée était la AAC(3)-IIb dans tous les genres testés (Dahmen, Bettaieb et al. 2010).

En Algérie, les gènes *aac(3')-II*, ont été identifiés chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* associés au gène *blaVIM-2* chez quelques souches dans une étude menée à l'ouest algérien (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

Egalement, ce gène a été identifié à l'échelle nationale chez des souches cliniques d'entérobactéries sur des plasmides associés aux gènes codant pour les types *CTX-M-3*, *CTX-M-15* et *CTX-M-28* et les gènes *qnrB* (Touati, Benallaoua et al. 2006; Meradi, Djahoudi et al. 2011; Baba Ahmed-Kazi Tani, Decre et al. 2013).

Nous avons révélé pour la première fois en Algérie chez les souches de *P.aeruginosa*, la détection du gène *aadA7*, ce dernier était trouvé sous forme de gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 de 1Kb chez six souches CRPA productrice de MBL. Et chez deux souches résistantes à l'imipénème.

L'acquisition des intégrons de classe 1 est considérée comme la principale cause de la multirésistance chez les espèces à Gram-négatif, principalement chez les entérobactéries et les *Pseudomonas*. Plusieurs études ont montré que 43% à 50% des isolats cliniques européens possédant les intégrons de classe 1 et que ces souches étaient statistiquement plus susceptibles d'être résistantes aux antibiotiques que les souches qui ne le possède pas (Jones, Peters et al 1997 ; Martinez-Freijo, Fluit et al. 1998).

En effet, la connaissance de la diversité et de l'organisation des intégrons est susceptible de permettre de suivre l'évolution des intégrons et d'évaluer leur rôle dans la multirésistance des bactéries à Gram négatif.

Discussion

En effet, tous les gènes *blaVIM-2* détectés chez *P. aeruginosa* en Tunisie étaient intégrés sous forme de cassette dans une structure en intégron de classe I (probablement inséré dans le chromosome) suggérant le rôle important de ce support génétique dans la dissémination de ce gène en Tunisie et expliquant en partie la multirésistance des souches tunisiennes qui portent souvent d'autres gènes de résistance.

Ces intégrons hébergent différents gènes cassettes, une étude menée par *Levesque et ses collaborateurs* montre qu'environ 75% des isolats cliniques résistants aux aminoglycosides possèdent des intégrons (Levesque, Piche et al. 1995). D'autres études ont rapportées des relations significatives entre la présence de ces intégrons et la résistances aux différentes classes d'antibiotiques (Khoramrooz, Sharifi et al. 2016).

En Afrique, les intégrons de classe 1 ont été signalés dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa*. *Labuschagne et al* ont rapporté la présence de *blaGES-5* comme des gènes cassette portés par des intégrons de classe 1 en Afrique du Sud.

Une autre étude au Nigeria a rapportée que les gènes cassette principalement détectés dans tous les intégrons de classe 1 appartiennent à la famille *aadA* conférant la résistance à la streptomycine et la spectinomycine.

En Tunisie, *Hammami et ses collaborateurs* ont montré que des intégrons de classe 1 contenant *blaVIM-2*, *aacA7* et *aacA4*, ainsi que *aadB* et *arr6*, un nouveau gène de résistance à la rifampicine parmi 35 *P. aeruginosa* ont été détectés (Hammami, Gautier et al. 2010).

La prévalence élevée des intégrons de classe 1 avec une variété de cassettes de gènes dans *P. aeruginosa* a été rapporté dans d'autres études (Fonseca, Vieira et al. 2005; Ruiz-Martínez, López-Jiménez et al. 2011; Hsiao, Lee et al. 2014).

Au niveau de CHU d'Annaba, seulement les gènes *aadB* et *aacA4* ont été identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase VIM-2 (Touati, Diene et al.2013).

Les gènes *aadA1* et *aadA13* ont été récemment décrit en Algérie chez des souches cliniques de *P.aeruginosa* associés au gène *blaVIM-2* à Tlemcen (Sefraoui, Berrazeg et al. 2014).

Des gènes de types *aada2* et *aada1* ont été également rapportés très récemment chez des souches cliniques de *S.marcescens* et *K.pneumoniae* au niveau de la région d'Annaba (Belbel,

Discussion

Chettibi et al. 2014; Batah, Loucif et al. 2015). Egaleme nt chez des souches de *K.pneumoniae* à Sétif (Bakour, Sahli et al. 2014).

Nous avons révélé pour la première fois en Algérie chez une souche de *P.aeruginosa* hébergeait le *blaVIM-2*, la détection du gène *rmtB*, une méthyltransférase du 16S ARNr qui code pour la résistance à tous les aminosides. Ce gène modifie la position N-7 de nucléotide G1405 situé dans le site A ARNr 16S et confère une résistance de haut niveau à tous les aminosides disponibles pour la thérapie, à l'exception de la streptomycine (Périchon, Bogaerts et al. 2008; Yu, Yao et al. 2010; Wachino and Arakawa 2012).

A l'échelle internationale le gène *rmtB* a été initialement trouvé dans une souche de *Serratia marcescens* isolée d'un patient japonais en 2002, Après ce gène a été trouvé chez plusieurs bactéries à Gram négatif à savoir les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans de nombreuses régions spécifiquement en Asie (Galimand, Courvalin et al. 2003; Doi, Yokoyama et al. 2004; Yu, Yao et al. 2010). D'autres variants de ce gène ont été détectés chez *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, et *E. coli*, respectivement, au Japon (Yokoyama, Doi et al. 2003; Wachino and Arakawa 2012). Plusieurs études ont rapportés sa présence dans des souches d'entérobactéries dans différents régions en Asie, et par conséquent, ce gène est considéré comme le plus répandu des méthyltransférase du 16S ARNr parmi les *Enterobacteriaceae* isolé en Asie. (Wu, Zhang et al. 2009).

A l'échelle nationale, seulement le gène *armA* a été identifié chez plusieurs souches d'entérobactéries (*K.pneumoniae*, *E.coli*, *E.aerugenes*, *E.cloacae*, *C.amalonaticus*) isolées chez quatre patients algériens transférés en Belgique (Bogaerts, Galimand et al. 2007).

Au CHU d'Annaba, le gène *armA* a été trouvé chez des souches de *K.pneumoniae* associées aux gènes *CTX-M15* (Belbel, Chettibi et al. 2014), et chez des souches de *Salmonella non-typhi* associé aux gènes *CTX-M-15* et *CMY-2* (Bouzidi, Aoun et al.2011).

Ces résultats rapportés, montrent en outre la large diffusion des gènes de type méthylase ARNr 16S entre les bactéries à Gram négatif, et la propagation de ces gènes est devenue une grande préoccupation pour les patients hospitalisés.

Cependant, la plupart des souches s'avèrent résistantes aux aminoglycosides sans gènes de résistance détectées, cela nécessitera une recherche plus approfondie et peut être expliqué par

Discussion

la possibilité d'acquisition de la résistance suite à d'autres mécanismes de résistance probablement non enzymatique.

Profil moléculaire de la résistance aux quinolones

PMQR gènes ont été trouvés dans une variété d'*Enterobacteriaceae*, en particulier *Escherichia coli* et des espèces d'*Enterobacter*, *Klebsiella*, et *Salmonella*. Ils ont été visiblement rares chez les non-fermenteurs, mais ont parfois été rapportés chez *Pseudomonas aeruginosa* (Jacoby, Strahilevitz et al. 2015). Nos résultats sont en concordance avec la littérature ou on a révélé un faible pourcentage (1%) soit un seul isolat de *P.aeruginosa* possédait le gène *qnrB2* qui code pour une faible résistance aux fluoroquinolones.

Notre étude a révélé la première détection du gène *qnrB-2* en Algérie au sein des souches clinique de *P.aeruginosa*.

Dans les pays du nord d'Afrique, plusieurs études ont rapporté la présence de ces gènes dans différents espèces bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

En Tunisie, les études de surveillance ont rapporté une augmentation de la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries, avec prédominance de la dissémination des déterminants de résistance de type *qnr*. En effet, le gène *qnrB* était le plus répandu parmi les souches d'*Enterobacter cloacae* alors que le gène *qnrA* était le plus répandu chez *K. pneumoniae*. Cependant, la répartition globale des gènes *qnr* en Tunisie au sein des entérobactéries a montré la prédominance du gène *qnrB*.

Au Maroc, une prédominance du gène *qnrB* a été également observée dans une étude rétrospective portée sur 39 isolats d'entérobactéries, ou 23%, 10%, 3% des souches isolées ont hébergé le gène *qnrB*, *qnrA* et *qnrS* respectivement (Bouchakour, Zerouali et al. 2010).

Les gènes de résistance aux fluoroquinolones sont d'identification récente en Algérie. La première étude qui a rapporté la présence des gènes *qnr* fut en 2008 chez des souches d'*E. cloacae* et une souche d'*A.baumannii* porté le gène *qnrB* et *qnrA* respectivement (Touati, Brasme et al.2007). Récemment, une étude récente à l'ouest Algérien à montré que 10 % des souches de *K.pneumoniae* isolées à l'hôpital de Tlemcen hébergeaient le gène *qnrB2* (Baba Ahmed-Kazi Tani, Decre et al. 2013).

Discussion

Par la suite, plusieurs études ont identifié différents variants de déterminants *qnr* souvent en association avec le gène *aac(6')-Ib-cr* chez des souches d'entérobactéries (Baba Ahmed-Kazi Tani, Decre et al. 2013; Baba Ahmed-Kazi Tani and Arlet 2014).

Au niveau de CHU d'Annaba, les variants, *qnrB-6*, *qnrB-42*, ont été rapporté (Meradi, Djahoudi et al. 2011; Belbel, Chettibi et al. 2014; Batah, Loucif et al. 2015).

Dans cette étude la plupart des souches de *P.aeruginosa* présentaient une résistance à la ciprofloxacine et/ou lévofloxacine sans la production de déterminant plasmidique de résistance aux quinolones. Ce résultat suggère que le principal mécanisme de résistance aux fluoroquinolones de nos souches est probablement dû à des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les gyrases ou les topoisomérases.

Profil phénotypique de la virulence

La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *P.aeruginosa*. En effet, *P.aeruginosa* est l'un des principaux agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales (Lister, Wolter et al. 2009), avec un réservoir essentiellement hospitalier et une capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance et de virulence. Ces infections sont très favorisées par la mise en place de matériels invasifs comme les sondes vésicales pour les infections urinaires, les cathéters intra-vasculaires pour les bactériémies et les sondes d'intubation pour les pneumopathies nosocomiales chez les patients ventilés mécaniquement. Ces dispositifs altèrent les défenses naturelles de l'organisme et créent une brèche qui favorise la contamination de milieux normalement stériles.

Dans notre étude, 100% des isolats cliniques de *P.aeruginosa* ont été en mesure de former un biofilm sur un substrat de polystyrène et les meilleurs producteurs de biofilm étaient des souches CRPA, suggérant la formation de biofilm comme étant un mécanisme qui favorise la résistance aux agents antimicrobiens (Sommerfeld Ross and Fiegel 2012). Ce ne fut pas surprenant, étant donné que *P.aeruginosa* tend à former des biofilm à la surface des cathéters urinaires ont augmenté la possibilité de dissémination des bactéries à l'appareil urinaire, provoquant une infection.

Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans de nombreuses infections chroniques et infections sur matériels. Leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques

Discussion

en font de véritables problèmes de la santé publique. *Le Center for Disease Control* (CDC) estime que 65 % des infections nosocomiales sont causées par un biofilm. D'après le *United States National Institute of Health* (NIH), 80 % des infections chroniques sont liées à la formation d'un biofilm (Monroe 2007).

Il serait donc intéressant pour les laboratoires de Bactériologie de disposer d'une technique universelle (phénotypique ou génotypique) permettant de prédire *in vitro* la capacité d'une souche à former un biofilm. De nombreuses méthodes d'étude de biofilm ont été décrites, en particuliers pour le *Staphylocoque* (Tote, Vanden Berghe et al. 2008; Sandberg, Schellmann et al. 2009; Oliveira and Cunha Mde 2010). Au cours de ce travail, nous en avons utilisé la méthode au Crystal Violet, la plus anciennement utilisé qui fait office de référence.

La majorité des auteurs utilisent une coloration au CV pour quantifier le biofilm formé. C'est une méthode assez laborieuse et difficile à standardiser. En utilisant cette technique, Nos données ont identifié que 100% des isolats étudiés produit un biofilm. Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés dans différentes études en Iran, *Ghanbarzadeh et ses collaborateurs* dans une étude menée au centre des brûlés en Iran ont rapporté que 92,4% des isolats de *P. aeruginosa* produit un biofilm.(Ghanbarzadeh Corehtash, Khorshidi et al. 2015) Dans une étude réalisée par *Jabalameli et al*, en Iran, a montré que 96,9% des isolats étudiés ont produit un biofilm.(Jabalameli, Mirsalehian et al.2012).

Olejnízková et Holá (2012) ont observé que 80% des souches de *P. aeruginosa* isolées à partir de cathéters étaient capables de former un biofilm en utilisant la méthode de CV sur une plaque de microtitrage en polystyrène(Olejnickova and Hola 2012). *Karatuna et Yagci* (2010) ont constaté que 86% des souches de *P. aeruginosa* isolées à partir des voies respiratoires forment un biofilm sur des microplaques en polystyrène(Karatuna and Yagci 2010).

Wolska et Kot (2013) ont rapporté que 100% des isolats de *P. aeruginosa* isolés de différents sites anatomiques ont été capables de former un biofilm, environ la moitié d'entre eux ont formé un biofilm fort et les principaux producteurs étaient des isolats de matières fécales et de prélèvements cutanés(Wolska and Kot 2013). Egalement une étude récente menée Au maroc sur 123 souches de *P.aeruginosa* a montré que toutes ses souches étaient capables de former un biofilm parmi les quelles environ 62% avaient une capacité modérée de formation du biofilm, les meilleurs producteurs de biofilm étaient des souches isolées à partir de des patients et de l'environnement hospitalier (Maroui Itto, et al 2016).

Discussion

Pseudomonas aeruginosa synthétise différents types de protéases, telles que l'élastase (LasA et LasB), la protéase alcaline, protéase IV (PIV) et *P. aeruginosa* petite protéase (PASP), qui participent à plusieurs événements physiologiques cellulaires (par exemple, la nutrition, la croissance et la prolifération) ainsi que dans les étapes essentielles du processus infectieux (par exemple, l'adhérence, l'invasion, la dégradation des barrières de l'hôte, la diffusion et l'échappement immunitaire) (Thibodeau and Butterworth 2013).

La grande majorité des isolats cliniques et environnementaux de *P. aeruginosa* produit des enzymes protéolytiques dont l'activité plus spécifiquement élastolytique (Toder, Ferrell et al. 1994; Tingpej, Smith et al. 2007). Dans ce contexte, Hamood *et al.* (1996) ont décrit que 77 souches de *P. aeruginosa* isolées de la trachée, des voies urinaires et de l'urine produisent des niveaux élevés de l'élastase (Hamood, Griswold et al. 1996). Une étude réalisée au Laboratoire Clinique de microbiologie à l'hôpital Foothills (Alberta, Canada) a révélé que des souches de *P. aeruginosa* isolées d'infections pulmonaires aiguës ont pu sécréter des molécules avec des quantités élevées d'activité élastolytique (Woods, Hwang et al. 1988). Enfin, Karatuna *et Yagci* (2010) ont décrit que sur 100 souches de *P. aeruginosa* 76 souches obtenues à partir d'échantillons cliniques respiratoires inférieures (crachats, aspiration trachéale et un lavage broncho-alvéolaire) ont été en mesure de produire des quantités élevées d'élastase (Karatuna and Yagci 2010). D'une manière générale, nos résultats sont en concordance avec la littérature, des taux élevés de la production des protéases a été indiqué, cette production était tout à fait semblable à la quasi-totalité des souches cliniques de *P. aeruginosa* étudiés.

La production de la pyocyanine a été observée chez 100% des isolats étudiés. Ce facteur de virulence est constitué d'un pigment bleu de phénazine produit exclusivement par *P. aeruginosa* il est responsable des lésions tissulaires à travers la formation de radicaux superoxydes et hydroxyles réactifs, principalement dans l'épithélium respiratoire (Rada, Jendrysik et al. 2013).

Certaines études rapportent que la production de la pyocyanine par des isolats de *P. aeruginosa* est comprise entre 41,3% et 81,5%.

La surproduction de pyocyanine a été détectée dans les différentes sécrétions des voies respiratoires des patients infectés par *P. aeruginosa*, comme les crachats des individus atteints de bronchiectasie (27,3G/ml), aspiration bronchique (16,5G/ml) et les expectorations (46,8 g/ml) de patients atteints de mucoviscidose et, en outre, elle est associée à la gravité de la

Discussion

maladie, le déclin de la fonction pulmonaire et de l'établissement de *P. aeruginosa* dans le poumon. (Rada and Leto 2013). Des souches de *P. aeruginosa* isolées à partir d'expectorations des patients atteints de fibrose kystique à l'Hôpital pour enfants de Boston (Etats-Unis) ont été en mesure de produire des quantités élevées (moyenne de 22,5g / ml) (Hunter, Klepac-Ceraj et al. 2012). Al-Ani et al. (1986) ont observé une production accrue de souches de pyocyanine isolées à partir d'urine (14,34 G / ml) par rapport à celles isolées de plaies (5,12 G / ml), du pus (4,78 G / ml) et de l'oreille (0,17 G / ml). (Al-Ani, Al-Shibib et al. 1986). De même, dans notre travail expérimental, toutes les souches cliniques de *P. aeruginosa* sécrétées le pyocyanine à différents niveaux.

La production d'hémolysine qui représentait 93,4%, correspond à d'autres facteurs de virulence associés à une lésion tissulaire. La production d'hémolysine est considéré comme étant un important facteur de virulence de *P. aeruginosa*, comme indiqué par Majtan et al et Woods et al (Woods, Schaffer et al. 1986; Majtan, Hostacka et al. 2002). Dans l'étude menée par Majtan 52% des souches étaient capables de produire l'hémolysine.

De même Stehling et al ont montré que sur un total de 120 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, isolée de la fibrose kystique (FK) et chez des patients ayant des infections extra-pulmonaires ont été étudiés, 51.7% (60/) étaient capable de produire de l'hémolysine (Stehling, Silveira et al. 2008).

Un taux élevé de la production de cette exoenzyme a été rapporté par l'étude de Jacome et ses collaborateurs, 93.4% des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées de cinq hôpitaux publics à Recife, Pernambouco, Brésil (Jacome, Alves et al. 2012).

Chez *P. aeruginosa*, les facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et biotiques. La mobilité est considérée par certains auteurs comme un facteur impliqué dans la capacité des souches à former un biofilm. Dans la présente étude trois types de mobilité ont été visualisé sur différents milieux de culture.

Les résultats obtenus ont montré une hétérogénéité, les CRPA étaient fortement productrices de biofilm dont les trois type de la mobilité sont exprimés par toute les souches. Pour le reste des souches la formation de biofilm et la mobilité sont différentes, parmi les souches peu formatrice de biofilm, certaines sont très mobiles et d'autres non et l'inverse.

En effet, O'Toole et Kolter ont développé une méthode de criblage génétique qui a permis de caractériser un certain nombre de déterminants importants dans la formation de biofilm (O'Toole and Kolter 1998). Le flagelle polaire unique de *P. aeruginosa* est hautement

Discussion

réglementée impliquée à la fois dans la mobilité de type *Swimming* et à la fixation aux surfaces.

O'Toole et Kolter ont confirmé, en utilisant la microscopie, qu'un mutant défectueux dans la formation du flagelle n'adhère que très faiblement au support (O'Toole and Kolter 1998). *Alain Filloux et ses collaborateurs* ont montré que non seulement la présence du flagelle mais, également, son fonctionnement normal est important pour l'attachement au support (Filloux and Vallet 2003). En effet, des mutants dans les gènes *motA* ou *motY*, qui codent pour des éléments du moteur du flagelle mais dont l'inactivation n'empêche pas l'assemblage, sont incapables d'adhérer à un support. Ces observations indiquent que le flagelle est particulièrement important pour l'approche du support (Barraud, Moscoso et al. 2014).

Les pili de type IV sont des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram négatif, dont *P. aeruginosa*, en utilisant la technique au CV sur microplaque, *O'Toole et Kolter* (1998) ont montré que les flagelles sont requis pour la formation de biofilm par *P. aeruginosa PA14* et que les pili de type IV sont nécessaires pour la formation de biofilm et des microcolonies par cet organisme. Les résultats obtenus par *O'Toole et ses collaborateurs* ont montré que contrairement aux mutants dépourvus d'un flagelle fonctionnel, les mutants dont la biogenèse des pili de type IV est affectée peuvent former une monocouche cellulaire sur un support, mais sont en revanche incapables de former les microcolonies caractéristiques. Cette observation confirme que la formation des microcolonies est bien un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité, et non pas seulement une croissance clonale à partir d'une cellule bactérienne donnée (O'Toole and Kolter 1998). En se basant sur une autre technique, *Heydorn et al* (2002) ont montré que la souche sauvage *P.aeruginosa PAO1* a formé un biofilm plat uniforme sans microcolonies, tandis que un mutant déficient de la motilité de type *Twitching* dérivé de cette souche sauvage *PA O 1* est capable à la fois de former un biofilm et des microcolonies (Heydorn, Ersboll et al. 2002). Ces observations contrariées suggèrent que les études de biofilm sont sensibles à la fois aux conditions expérimentales et le type de la souche étudiée.

Le *Swarming* est l'un des types de motilité à travers lequel des cellules bactériennes se déplacent pour faciliter une infection systémique et/ou la formation de biofilm. Aucun lien direct entre le *Swarming* et la virulence n'a été rapporté à ce jour chez *P.aeruginosa*. Cependant il est bien établi que le *Swarming* dépend des RL (Deziel, Lepine et al. 2003;

Discussion

Caiazza, Shanks et al. 2005). Or, plusieurs travaux ont été effectués sur la relation entre les RL et la virulence (Soberon-Chavez, Aguirre-Ramirez et al. 2005; Soberon-Chavez, Lepine et al. 2005).

Récemment, plusieurs études ont rapporté que les RL jouent un rôle central dans le développement des biofilms (Davey, Caiazza et al. 2003; Lequette and Greenberg 2005; Wang, Yu et al. 2014), qui sont intimement impliquées dans les infections causées par *P.aeruginosa*. Etant donné que les RL sont aussi étroitement liés au *Swarming*, il existe assurément un lien entre les biofilms et le *Swarming* (Costerton 1999). D'ailleurs, *Shrout et collègues* ont récemment rapporté que des conditions limitant le *Swarming* favorisent la formation de biofilm structuré alors qu'en conditions favorisant le *Swarming*, les biofilms formés étaient plats sans structure bien définies (Shrout, Chopp et al. 2006; Shrout, Tolker-Nielsen et al. 2011).

Etude de l'effet de deux antibiotiques sur la formation de biofilm des souches de *P.aeruginosa*

Seules 4 souches de *P.aeruginosa* isolées de pus des patients admis dans le service de brûlés ont été retenues pour cette partie, le choix a été fait selon leur biotypie, antibiotypie, production de MBL, la clonalité et leurs grandes capacités de former le biofilm.

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms au milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants). Cette résistance accrue est multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.). Elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus (Mulcahy, Isabella et al. 2014).

Alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître après traitement.

En conséquence l'éradication et/ou l'inhibition de la formation du biofilm reste un sérieux problème de santé publique.

Afin d'étudier l'effet des ATB sur les biofilms formés, deux antibiotiques largement utilisés dans les services étudiés (imipénème et ciprofloxacine) ont été utilisés.

Discussion

De façon générale, nos résultats montrent que les isolats de *P. aeruginosa* cultivés avec ces antibiotiques dans des microplaques ont présenté une augmentation de leur capacité de formation de biofilm par rapport aux mêmes souches cultivées en absence de ces antibiotiques, ce qui confirme que ces concentrations utilisés pour toutes les souches sélectionnées (n= 4) ont un effet inducteur de formation de biofilm.

En effet, plus d'une douzaine d'études ont examiné l'effet d'antibiotiques sur la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Parmi ceux-ci, plusieurs études sont en concordance avec nos résultats, ils ont démontré l'induction de la formation de biofilm en réponse à des concentrations sous inhibitrices de diverses aminoglycosides, β -lactamines et les macrolides (Kaplan 2011; Aka and Haji 2015; Rybtke, Hultqvist et al. 2015).

La réponse de *P. aeruginosa* à des concentrations sous-CMI des aminosides a été étudiée en détail. *Hoffman et al* ont constaté que les sous-CMI de tobramycine facilement induits la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Hoffman, D'Argenio et al. 2005).

Cependant, d'autres travaux ont montré une hétérogénéité dans la réponse de formation de biofilm aux antibiotiques chez *P.aeruginosa*, tel que les travaux de *Kaplan et al* qui ont montré que plusieurs antibiotiques avec des modes variés d'action, y compris la polymyxine B (un peptide active sur la membrane), chloramphénicol (un inhibiteur de la traduction) et carbénicilline (un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire), n'a eu aucun effet sur la formation de biofilm (Kaplan 2011).

De même, *Marr et al* a également étudié le mécanisme d'induction de formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en présence des aminoglycosides, en présence d'une concentration de 1/4 sous-CMI de gentamicine, ils ont constaté que parmi les mutants utilisé, 11 mutants présentaient une augmentation d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse des fimbriae, la production d'alginate, et la régulation de la motilité ainsi que d'autres gènes impliqués dans le transport de soluté, la résistance aux antibiotiques, le métabolisme énergétique, la régulation transcriptionnels, et des gènes de fonction inconnue (Marr, Overhage et al. 2007).

Ces résultats démontrent que le criblage de banques de mutants est susceptible d'être une approche utile pour élucider les mécanismes de la formation de biofilms induite par des antibiotiques.

Linares et al ont montré que les concentrations de la tobramycine, la ciprofloxacine et la tétracycline ont un effet inducteur sur des biofilm de *P. aeruginosa* par environ 2 fois en

Discussion

utilisant la technique de CV. Les concentrations d'antibiotique qui a provoqué l'induction de biofilm maximale étaient au niveau ou juste au-dessus de la concentration qui provoque une diminution du taux de croissance. En utilisant la technologie des puces à ADN, ces auteurs ont constaté que les concentrations des trois antibiotiques ont entraîné une augmentation de l'expression de 5% à 7% de 555 gènes impliqués dans le processus de colonisation chronique, la résistance aux antibiotiques, régulation de la transcription, et la réponse au stress, y compris certains gènes qui avaient été précédemment montré à jouer un rôle dans la formation de biofilm (Linares, Gustafsson et al. 2006).

Bagge et al ont également utilisé la technologie des biopuces pour étudier les effets de l'imipénème sur la formation de biofilm de *P.aeruginosa*.

Ils ont identifié 34 gènes qui ont été induits ou réprimés dans les biofilms exposés à une concentration 1/2 sous-CMI d'imipénème. Parmi ceux-ci, cinq gènes impliqués dans le métabolisme de l'alginate (*algD*, *algG*, *algJ*, *algF* et *algA*) ont été induits plus de 10 fois par cette concentration. La production d'alginate et la formation de biofilm ont également augmenté, ce qui indique que l'induction de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* en réponse à des sous-CMI de β -lactamines implique évidemment une régulation positive de la biosynthèse d'alginate (Bagge, Schuster et al. 2004).

Ces résultats obtenus indiquent que les bactéries d'un biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques que ces mêmes bactéries sous forme planctonique.

En fait, les concentrations antimicrobiennes nécessaires pour inhiber les biofilms bactériens peuvent être 10-1000 fois plus élevées que celles qui sont nécessaires pour inhiber les mêmes bactéries sous forme planctonique (Simoes 2011). La nature moléculaire de cette résistance apparente n'a pas été bien élucidée, et un certain nombre de mécanismes ont été proposées pour expliquer la diminution de la pénétration des antibiotiques (Ito, Taniuchi et al. 2009). Les bactéries dans les biofilms diffèrent d'un point de vue physiologique et métabolique des homologues planctoniques, cette différence est due à la résistance accrue des biofilms aux agents antimicrobiens (Mulcahy, Isabella et al. 2014).

La capacité des bactéries à développer une résistance aux antibiotiques et à coloniser les surfaces abiotiques en formant des biofilms est une cause majeure d'infections associées aux implants médicaux, ce qui engendre une prolongation des périodes d'hospitalisation ainsi qu'un taux élevé de mortalité.

Discussion

Plusieurs approches de lutte contre les biofilms ont été décrites. Certaines consistent à rechercher des molécules qui interfèrent avec les mécanismes de communication nécessaires au développement de ces communautés microbiennes. De telles molécules empêcheraient les biofilms d'acquiescer l'organisation responsable de ses propriétés de résistance. D'autres, consistent à rechercher des molécules qui bloquent la synthèse de la matrice, car elle constitue l'armure de protection des microorganismes. Enfin, il faut chercher à développer des surfaces anti-biofilm par recouvrement des surfaces de matériaux avec des agents antimicrobiens qui inhiberaient ou réduiraient la formation des biofilms.

Par conséquent, l'identification de nouveaux agents antimicrobiens qui inhibent ou détruisent les biofilms est très nécessaire.

Nos résultats restent donc très préliminaires, mais confirment tout de même la grande variabilité de la production de différents facteurs de virulence *in vitro* par des isolats cliniques indépendants, l'impact des modifications des conditions environnementales, et la très grande complexité des mécanismes impliqués, qui peuvent être différents d'une souche à l'autre en fonction de son patrimoine génétique.

Bien entendu, et bien que ces techniques *in vitro* soient très largement utilisées, une question fondamentale demeure : existe-il une corrélation entre ce qui est observé *in vitro* et ce qui est se passe *in vivo* ? L'approfondissement des connaissances dans ce domaine passe sans doute par la mise au point de modèles animaux, dont on connaît la complexité.



Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'antibiothérapie a été l'un des progrès décisifs de l'histoire de la médecine, elle est aussi à l'origine de l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR) contre lesquelles les antibiotiques sont devenus totalement inefficaces. La menace existe dans les pays développés mais aussi dans les pays en voie de développement où cohabitent l'automédication et la vente anarchique des médicaments en dehors des structures légales.

Avec plus de 250 antibiotiques systémiques disponibles, on a pu croire que la lutte contre les maladies infectieuses n'était plus qu'un problème de choix de la bonne molécule; à l'évidence c'était la fin du « miracle »; l'idée d'éradication n'était qu'un mythe dangereux; les maladies infectieuses font aujourd'hui un retour en force. Selon les données de l'OMS, en 1998, les maladies infectieuses ont été la cause de 25% des décès dans le monde entier. Dans les pays en voie de développement, 50% des décès sont imputables aux maladies infectieuses (60% chez les enfants de 0 à 4 ans).

Face à cette préoccupation mondiale, plusieurs études ont été rapportées avec des recommandations importantes, de conduire des études épidémiologiques, moléculaires et génomiques afin de contrôler la diffusion et l'augmentation de la multirésistance aux antibiotiques.

Depuis l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa* en tant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites. Les travaux, portant sur la résistance aux antibiotiques dans les pays méditerranéens, montrent en général que les métallo- β -lactamases de type VIM-2 sont les carbapénèmases les plus répandues dans ces pays.

Notre étude a porté sur 110 souches de *P. aeruginosa* non-dupliquées collectées à partir de prélèvements pathologiques provenant de différents CHU d'Annaba à l'Est algérien. Ces souches de *P.aeruginosa* identifiées dans cette étude présentent un taux de 60% des cas isolées à partir des deux services de brûlés et d'endocrinologie et les prélèvements concernés proviennent dans plus de la moitié des pus.

La détermination des niveaux de la résistance aux antibiotiques par la diffusion sur milieu gélosé et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches de *P.aeruginosa* montre une résistance considérablement élevée vis-à-vis des β -lactamines, des aminosides et des fluoroquinolones.

Cette étude a révélé que la présence d'inactivation par mutation du gène *oprD* est le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa*, suivi par l'acquisition de

Conclusion et Perspectives

métallo- β -lactamases *VIM-2* et *VIM-4*. Ces résultats pourraient être dus à une utilisation irrationnelle de l'imipénème dans le traitement des bactéries à Gram négatif multirésistantes dans nos hôpitaux.

Dans la présente étude, nous avons révélé pour la première fois en Algérie des souches de *P.aeruginosa* porteuses du gène *VIM-4* une métallo- β -lactamase qui confère une résistance à la dernière molécule en thérapeutique infectieuse « l'imipénème » compliquant ainsi la prise en charge des patients infectés.

Ainsi cette étude a révélé la première fois en Algérie une seule souche porteuse du gène *rtmB*, une méthyltransférase du 16S ARNr qui code pour la résistance à tous les aminosides. La souche qui héberge le gène *rtmB* a exprimé de hauts niveaux de résistance à l'amikacine, à la gentamicine et à la tobramycine.

Les données épidémiologiques montrent bien que si la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques n'augmente pas de façon globale en Algérie, la nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec l'émergence de carbapénèmases. Ces souches en règle multirésistantes restent encore confinées sous forme de petits foyers en Algérie, mais le risque d'extension est bien présent. Le risque d'importation à partir de pays voisins où ces souches sont plus répandues, comme c'est le cas aujourd'hui dans les pays méditerranéens, doit également être pris en compte. Ceci doit donc appeler à une forte vigilance en dépistant précocement ces mécanismes de résistance et renforcer les mesures d'hygiène autour des cas d'infection ou de portage afin d'éviter leur transmission.

L'analyse par PFGE montre que la majorité des isolats multirésistants appartiennent à quelques clones épidémiques présents dans plusieurs régions. Nos résultats indiquent que la transmission croisée joue un rôle majeur dans la dissémination et la propagation des souches BMR à l'hôpital et suggère que la priorité doit être donnée à l'amélioration des procédures d'hygiène standard.

La résistance de *P. aeruginosa*, aux fluoroquinolones et aux aminosides est devenue préoccupante en milieu hospitalier. L'avènement de ces mécanismes de résistance implique une utilisation plus rationnelle de ces antibiotiques tant qu'en milieu hospitalier qu'en médecine communautaire. Les souches isolées à partir du service des brûlés, en particulier sont résistantes à plusieurs β -lactamines, présentaient des résistances associées aux aminosides et à la ciprofloxacine. Notons également la présence du gène *aac(3')-II* ainsi que

Conclusion et Perspectives

les gènes *aadA7* et *RtmB* responsables de la résistance à ces antibiotiques chez quelques isolats. D'autres gènes de résistance aux aminosides ont été identifiés dans la même période d'étude à l'est algérien, à savoir les gènes *aadB* et *aacA4*, identifiés sur des gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1 chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* productrices de la métallo- β -lactamase *VIM-2* (Touati et al., 2013).

L'évaluation de formation de biofilm de nos isolats par la technique de Crystal violet a révélé que la totalité des souches avait la capacité de former un biofilm au bout de 6 heures d'incubation sur un substrat de polystyrène.

Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'importance des biofilms sur dispositifs médicaux tient entre autre à leurs fortes résistances (rôle de la matrice d'exopolysaccharides) et à la difficulté d'imprégnation par les antibiotiques. La faible efficacité de certains antibiotiques étudiés lors de ce travail tel l'imipénème et la ciprofloxacine vis-à-vis des *P.aeruginosa* sessiles expliquerait la nécessité de rechercher d'autres moyens de lutte.

L'adhésion des microorganismes aux surfaces serait un facteur non négligeable dans la résistance bactérienne aux antibiotiques ce qui pourrait expliquer l'émergence très rapide de *P.aeruginosa* MBL dans notre étude.

Les mesures de prévention de la transmission croisée soulignent les enjeux économiques de l'amélioration de l'hygiène hospitalière et de la lutte contre la surinfection acquise à l'hôpital. Il serait intéressant de mettre en œuvre un programme de formation d'hygiénistes au sein des hôpitaux ainsi que des enquêtes de consommation d'antibiotiques en Algérie, à l'hôpital comme en ville, ainsi qu'un programme d'éducation et de formation des professionnels et des usagers.

La diffusion rapide des souches résistantes aux antibiotiques représente une menace thérapeutique et épidémiologique majeure et nécessite la mise en œuvre de procédures d'hygiène strictes et des études régulières de surveillance de cette résistance.

Mis à part le développement de mécanismes d'adaptation des bactéries pathogènes en milieu environnant, plusieurs facteurs favorisent l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance, comme l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, l'automédication ainsi que la prescription d'un traitement antibiotique sans la réalisation d'antibiogramme standard.

Bien que l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques à longterm contribué à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, des études récentes ont pu démontrer que la

Conclusion et Perspectives

résistance pouvait émerger à partir de sources anciennes et/ou environnementales, bien avant la découverte des antibiotiques (Rolain et al. 2012).

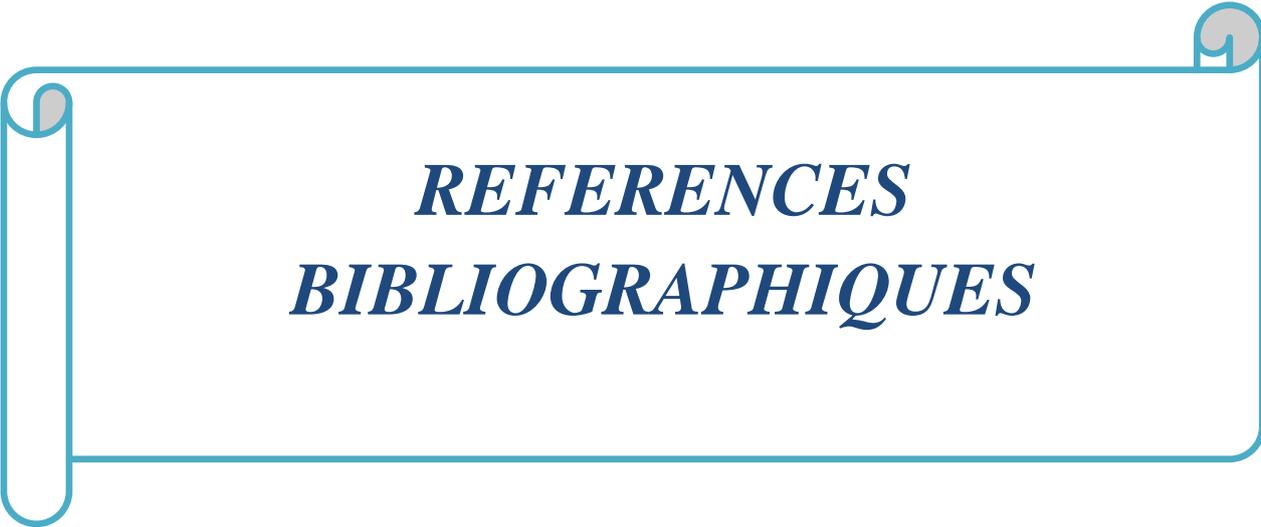
Ce travail ouvre les perspectives suivantes :

Pour pouvoir maîtriser la problématique de la multirésistance et le risque de l'émergence de la résistance aux carbapénèmes des bactéries à Gram négatif y compris *P. aeruginosa*; différentes approches ont été suggérées:

Un meilleur usage des antibiotiques, un meilleur respect des mesures d'hygiène afin de limiter la diffusion de ces bactéries, une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux antibiotiques afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, la constitution des comités au sein de différents établissements de santé chargés des programmes pour le contrôle des infections nosocomiales s'avère ainsi une priorité indispensable, et la nécessité de fournir des données épidémiologiques sur les souches clinique et établir des études plus profonde sur la dissémination des souches environnementales diffusées en milieu hospitalier.

Compte tenu du pouvoir épidémique élevé de ces souches et des impasses thérapeutiques auxquelles celles-ci peuvent conduire, le dépistage et la détection des gènes de résistance sont des éléments fondamentaux dans la maîtrise de leur dissémination. Néanmoins, sur le plan technique cette détection s'avère très difficile, voire impossible en Algérie, il serait donc nécessaire d'équiper les laboratoires de microbiologie du matériel approprié pour la détection rapide et fiable des gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques.

Enfin nous disons que la caractérisation et la connaissance d'autres facteurs spécifiques impliqués dans la formation du biofilm par cette bactérie pathogène constituerait une nouvelle approche dans la compréhension de l'installation du biofilm, sa conception et la mise au point d'une thérapeutique antimicrobienne.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aaron, S. D., W. Ferris, et al. (2002). "Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **40**(11): 4172-4179.
- Abdallah, H. B., S. Noomen, et al. (2008). "Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir." *Médecine et Maladies Infectieuses* **38**(10): 554-556.
- Adam, E. C., B. S. Mitchell, et al. (1997). "Pseudomonas aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(6): 2102-2104.
- Aggoune-Khinache, N., D. Bensersa, et al. (2009). "Pseudomonas aeruginosa producteurs de métallob- β -lactamases en Algérie." *Médecine et Maladies Infectieuses* **39**(6): 413-414.
- Agnihotri, N., V. Gupta, et al. (2004). "Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms--a five-year study." *Burns* **30**(3): 241-243.
- Aires, J. R., J. C. Pechere, et al. (2002). "Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(7): 2169-2173.
- Ait el kadi, M., M. Aghrouch, et al. (2006). "Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallob- β -lactamases." *Médecine et Maladies Infectieuses* **36**(7): 386-389.
- Aka, S. T. and S. H. Haji (2015). "Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine." *Braz J Microbiol* **46**(1): 149-154.
- Aktas, Z., L. Poirel, et al. (2005). "PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey." *Clin Microbiol Infect* **11**(3): 193-198.
- Al-Ani, F. Y., A. S. Al-Shibib, et al. (1986). "Pyocyanin preparation from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from heterogeneous clinical materials." *Folia Microbiol* **31**(3): 215-219.
- Al Bayssari, C., S. M. Diene, et al. (2014). "Emergence of VIM-2 and IMP-15 carbapenemases and inactivation of oprD gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Lebanon." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(8): 4966-4970.

Références bibliographiques

- Al Benwan, K., A. Al Mulla, et al. (2012). "A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait." *J Infect Public Health* **5**(1): 1-8.
- Allen, L., D. H. Dockrell, et al. (2005). "Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo." *J Immunol* **174**(6): 3643-3649.
- Amazian, K., J. Rossello, et al. (2010). "Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region." *East Mediterr Health J* **16**(10): 1070-1078.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036): 321-331.
- Ambler, R. P., A. F. Coulson, et al. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases, *Biochem J*. May 15;276 (Pt 1):269-70.
- Anlatıcı, R., O. R. Ozerdem, et al. (2002). "A retrospective analysis of 1083 Turkish patients with serious burns." *Burns* **28**(3): 231-237.
- antibiotiques, R. d. s. d. l. r. a. (2014). Ministère de la sante et de la population et de la réforme hospitalière **13^{ème}** 140.
- Atif, M. L., A. Bezzaoucha, et al. (2006). "Évolution de la prévalence des infections nosocomiales dans un centre hospitalier universitaire en Algérie (2001 à 2005)." *Médecine et Maladies Infectieuses* **36**(8): 423-428.
- Aubert, D., T. Naas, et al. (2012). "Integrase-mediated recombination of the *veb1* gene cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase." *PLoS One* **7**(12): 10.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z. and G. Arlet (2014). "Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie." *Pathologie Biologie* **62**(3): 169-178.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z. and G. Arlet (2014). "News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria." *Pathol Biol* **62**(3): 169-178.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., D. Decre, et al. (2013). "Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010)." *Microb Drug Resist* **19**(3): 185-190.
- Bagge, N., M. Schuster, et al. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(4): 1175-1187.
- Bah, A., J. Y. S. Bassinga, et al. (2015). "Diabetic foot in an orthopaedic setting: analysis and evaluation of our results." *Médecine et Chirurgie du Pied* **31**(1): 32-37.

Références bibliographiques

- Bahar, G., A. Mazzariol, et al. (2004). Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey, *J Antimicrob Chemother.* Jul;54(1):282-3.
- Bajolet-Laudinat, O., S. Girod-de Bentzmann, et al. (1994). "Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture." *Infect Immun* **62**(10): 4481-4487.
- Bakour, S., V. Garcia, et al. (2015). "Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test." *New Microbes New Infect* **7**: 89-93.
- Bakour, S., M. Kempf, et al. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria, *J Med Microbiol.* Sep;61(Pt 9):1341-3.
- Bakour, S., F. Sahli, et al. (2014). "Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria." *New Microbes New Infect* **3**: 34-36.
- Bakour, S., A. Touati, et al. (2013). "Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria." *Diagn Microbiol Infect Dis* **76**(4): 529-531.
- Balaban, N., A. Giacometti, et al. (2003). "Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* **187**(4): 625-630.
- Barbieri, J. T. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin." *Int J Med Microbiol* **290**(4-5): 381-387.
- Bardy, S. L., S. Y. Ng, et al. (2003). "Prokaryotic motility structures." *Microbiology* **149**(Pt 2): 295-304.
- Barguigua, A., F. El Otmani, et al. (2011). "Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco." *J Med Microbiol* **60**(Pt 9): 1344-1352.
- Barguigua, A., F. El Otmani, et al. (2013). "Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community." *Microb Pathog* **62**: 16-22.
- Barraud, N., J. A. Moscoso, et al. (2014). Methods for Studying Biofilm Dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas Methods and Protocols.* **1149**: 643-651.

Références bibliographiques

- Barraud, N., J. A. Moscoso, et al. (2014). "Methods for studying biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*." *Methods Mol Biol*: 0473-0470_0449.
- Batah, R., L. Loucif, et al. (2015). "Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria." *Microb Drug Resist* **21**(4): 470-476.
- Bebrone, C., P. Bogaerts, et al. (2013). "GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(1): 396-401.
- Belbel, Z., H. Chettibi, et al. (2014). "Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital." *Microb Drug Resist* **20**(4): 310-315.
- Bellido, F., C. Veuthey, et al. (1990). "Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate." *J Antimicrob Chemother* **25**(1): 57-68.
- Ben Haj Khalifa, A., D. Moissenet, et al. (2011). "Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation." *Ann Biol Clin* **69**(4): 393-403.
- Ben Jaballah, N., A. Bouziri, et al. (2006). "Épidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne." *Médecine et Maladies Infectieuses* **36**(7): 379-385.
- Benouda, A., O. Touzani, et al. (2010). "First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco." *Ann Trop Med Parasitol* **104**(4): 327-330.
- Bert, et al. (2000). *Pseudomonas aeruginosa : actualité sur la résistance aux β -lactamines et implications thérapeutiques*. Paris, FRANCE, Masson.
- Bert, F., C. Branger, et al. (2002). "Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism." *J Antimicrob Chemother* **50**(1): 11-18.
- Berthelot, P., F. Grattard, et al. (2005). "Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*." *Pathologie Biologie* **53**(6): 341-348.
- Bertrand, X., G. Blasco, et al. (2003). "*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission." *Ann Fr Anesth Reanim* **22**(6): 505-509.

Références bibliographiques

- Bertrand, X., C. Slekovec, et al. (2011). "Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*." *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**(435): 35-40.
- Bertrand, X., M. Thouverez, et al. (2001). "Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units." *Intensive Care Med* **27**: 1263 - 1268.
- Bjarnsholt, T., N. Hoiby, et al. (2012). Understanding biofilms--are we there yet?, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65(2):125-6.
- Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, et al. (2005). "Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent." *Microbiology* **151**(Pt 2): 373-383.
- Blackwood, L. L., R. M. Stone, et al. (1983). "Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection." *Infect Immun* **39**(1): 198-201.
- Blair, J. M., G. E. Richmond, et al. (2014). "Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance." *Future Microbiol* **9**(10): 1165-1177.
- Bogaerts, P., M. Galimand, et al. (2007). "Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium." *J Antimicrob Chemother* **59**(3): 459-464.
- Bogaerts, P., T. D. Huang, et al.(2008). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo-beta-lactamases, *J Antimicrob Chemother* **61**(3):749-51.
- Boles, B. R. and P. K. Singh (2008). "Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12503-12508.
- Boles, B. R., M. Thoendel, et al. (2005). "Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms." *Mol Microbiol* **57**(5): 1210-1223.
- Bouchakour, M., K. Zerouali, et al. (2010). Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco.
- Boutoille, D., C. Jacqueline, et al. (2009). "In vivo impact of the MexAB-OprM efflux system on beta-lactam efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection." *Int J Antimicrob Agents* **33**(5): 417-420.

Références bibliographiques

- Bouzidi, N., L. Aoun, et al. (2011). Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhi Salmonella isolates producing CTX-M-15 in Algeria, *J Antimicrob Chemother.* **66**(9):2180-1.
- Bure, A., P. Legrand, et al. (1988). "Dissemination in five French hospitals of Klebsiella pneumoniae serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**(6): 780-782.
- Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(3): 969-976.
- Cabrolier, N., J. Lafolie, et al. (2014). "Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à Pseudomonas aeruginosa." *Journal des Anti-infectieux* **16**(1): 8-12.
- Caiazza, N. C., R. M. Shanks, et al. (2005). "Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of Pseudomonas aeruginosa." *J Bacteriol* **187**(21): 7351-7361.
- Cambau, E., E. Perani, et al. (1995). "Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of Pseudomonas aeruginosa susceptible or resistant to imipenem." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(10): 2248-2252.
- Campbell, J. I., O. Ciofu, et al. (1997). "Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the ampC-ampR genetic region." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(6): 1380-1384.
- Castanheira, M., J. M. Bell, et al. (2009). "Carbapenem resistance among Pseudomonas aeruginosa strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18)." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(3): 1225-1227.
- Castro-Escarpulli, G., M. J. Figueras, et al. (2003). "Characterisation of Aeromonas spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico." *Int J Food Microbiol* **84**(1): 41-49.
- Cavalcanti, F. L., C. R. Mirones, et al. (2015). "Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Recife, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**(8): 1003-1009.
- Cavallo, J. D., F. Leblanc, et al. (2001). "Surveillance de la sensibilité de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux bêtalactamines : étude GERPB 1999." *Pathologie Biologie* **49**(7): 534-539.

Références bibliographiques

- Chaibdraa, A., M. S. Medjellekh, et al. (2008). "Le Pseudomonas: Experience du Centre des Brûlés D'Annaba et Revue de la Litterature." *Annals of Burns and Fire Disasters* **21**(4): 210-218.
- Chen, H. Y., M. Yuan, et al. (1995). "Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993." *J Med Microbiol* **43**(4): 300-309.
- Carle Gessard (1984). "Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. (1850-1925)." *Rev Infect Dis* **6**(3): S775-776.
- Cho, H. H., K. C. Kwon, et al. (2014). "Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Ann Lab Med* **34**(4): 286-292.
- Choi, Y. C. and E. Morgenroth (2003). "Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation." *Water Sci Technol* **47**(5): 69-76.
- Chopra, I. (1998). "Research and development of antibacterial agents." *Curr Opin Microbiol* **1**(5): 495-501.
- Comolli, J. C., A. R. Hauser, et al. (1999). "*Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia." *Infect Immun* **67**(7): 3625-3630.
- Corech, R., A. Rao, et al. (2005). "Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **43**(8): 3956-3962.
- Cornaglia, G., H. Giamarellou, et al. (2011). "Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams?" *Lancet Infect Dis* **11**(5): 381-393.
- Cornaglia, G., A. Mazzariol, et al. (2000). "Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase." *Clin Infect Dis* **31**(5): 1119-1125.
- Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." *Int J Antimicrob Agents* **11**(3-4): 217-221.
- Costerton, J. W. (2001). "Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection." *Trends Microbiol* **9**(2): 50-52.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, et al. (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.

Références bibliographiques

- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* **284**(5418): 1318-1322.
- Cowell, B. A., D. J. Evans, et al. (2005). "Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion." *FEMS Microbiol Lett* **250**(1): 71-76.
- Crespo, M. P., N. Woodford, et al. (2004). "Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia." *J Clin Microbiol* **42**(11): 5094-5101.
- Cryz, S. J., Jr., E. Furer, et al. (1983). "Protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a murine burn wound sepsis model by passive transfer of antitoxin A, antielastase, and antilipoplysaccharide." *Infect Immun* **39**(3): 1072-1079.
- Da Fonseca, E. L., V. V. Vieira, et al. (2007). Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil, *J Antimicrob Chemother.* **59**(3):576-7.
- Dacheux, D., I. Attree, et al. (1999). "Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system." *Infect Immun* **67**(11): 6164-6167.
- Dacheux, D., J. Goure, et al. (2001). "Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages." *Mol Microbiol* **40**(1): 76-85.
- Dahmen, S., D. Bettaieb, et al. (2010). "Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Tunisian University Hospital." *Microb Drug Resist* **16**(2): 163-170.
- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1999). "OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(6): 1362-1366.
- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1995). "Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **35**(2): 281-294.
- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1995). "OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(8): 1881-1884.
- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1997). "OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(4): 785-790.

Références bibliographiques

- Danel, F., L. M. Hall, et al. (1998). "OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(12): 3117-3122.
- Dasgupta, T., T. R. de Kievit, et al. (1994). "Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6." *Infect Immun* **62**(3): 809-817.
- Davey, M. E., N. C. Caiazza, et al. (2003). "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Bacteriol* **185**(3): 1027-1036.
- Davey, M. E. and A. O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 847-867.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, et al. (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." *Science* **280**(5361): 295-298.
- De Bentzmann, S., M. Aurouze, et al. (2006). "FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili." *J Bacteriol* **188**(13): 4851-4860.
- De Bentzmann, S. and P. Plésiat (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe." *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**(435): 73-81.
- De Champs, C., C. Chanal, et al. (2004). "Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study." *J Antimicrob Chemother* **54**(3): 634-639.
- Deziel, E., Y. Comeau, et al. (2001). "Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities." *J Bacteriol* **183**(4): 1195-1204.
- Deziel, E., F. Lepine, et al. (2003). "rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids." *Microbiology* **149**(Pt 8): 2005-2013.
- Diggle, S. P., R. E. Stacey, et al. (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." *Environ Microbiol* **8**(6): 1095-1104.

Références bibliographiques

- Dimude, J. U. and S. G. Amyes (2013). "Molecular characterisation and diversity in *Enterobacter cloacae* from Edinburgh and Egypt carrying bla(CTX-M-14) and bla(VIM-4) beta-lactamase genes." *Int J Antimicrob Agents* **41**(6): 574-577.
- Djahmi, N., N. Messad, et al. (2013). "Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital." *Clin Microbiol Infect* **19**(9): 1469-0691.
- Doi, Y. and Y. Arakawa (2007). "16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides." *Clin Infect Dis* **45**(1): 88-94.
- Doi, Y., D. de Oliveira Garcia, et al. (2007). "Coproduct of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 852-856.
- Doi, Y., K. Yokoyama, et al. (2004). "Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(2): 491-496.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* **8**(9): 881-890.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev* **15**(2): 167-193.
- Drenkard, E. (2003). "Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Microbes Infect* **5**(13): 1213-1219.
- Driffield, K., K. Miller, et al. (2008). "Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms." *J Antimicrob Chemother* **61**(5): 1053-1056.
- Drissi, M., Z. B. Ahmed, et al. (2008). "Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria." *Med Mal Infect* **38**(4): 187-191.
- Drissi, M., L. Poirel, et al. (2010). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **29**(11):1457-8.
- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2006). TEM-21 extended-spectrum beta-lactamase in a clinical isolate of *Alcaligenes faecalis* from a nursing home, *J Antimicrob Chemother*. **57**(2):368-9.
- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2008). "Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres)." *J Antimicrob Chemother* **62**(2): 316-323.

Références bibliographiques

- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2002). "Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3624-3626.
- Dubois, V., L. Poirel, et al. (2002). "Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(3): 638-645.
- Egly, et al. (1993). *Electrophorèse en champs alternés de l'ADN*. Cachan, FRANCE, Lavoisier.
- Ekrami, A. and E. Kalantar (2007). "Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran." *Indian J Med Res* **126**(6): 541-544.
- El-Mahdy, T. S. (2014). "The extended-spectrum AmpC genotype of *Pseudomonas aeruginosa* strains from Egypt: an underlying threat to anti-pseudomonal treatment options." *J Chemother* **26**(3): 187-189.
- El Garch, F., P. Bogaerts, et al. (2011). "OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(10): 4828-4833.
- Elhani, D., I. Elhani, et al. (2012). "[Resistance in Gram negative bacteria: what is the current situation?]." *Tunis Med* **90**(10): 680-685.
- Elmjendel, I., H. Mribah, et al. (2015). "Les infections respiratoires communautaires à *Pseudomonas aeruginosa*." *Revue des Maladies Respiratoires* **32**, **Supplement**: A169-A170.
- Essayagh, M., T. Essayagh, et al. (2014). "Epidemiology of burn wound infection in Rabat, Morocco: Three-year review." *Med Sante Trop* **24**(2): 157-164.
- Falagas, M. E., P. I. Rafailidis, et al. (2008). "Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients." *Int J Antimicrob Agents* **32**(5): 450-454.
- Feldman, M., R. Bryan, et al. (1998). "Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection." *Infect Immun* **66**(1): 43-51.
- Feltman, H., G. Schulert, et al. (2001). "Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **147**.
- Filloux, A. and I. Vallet (2003). "[Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]." *Med Sci* **19**(1): 77-83.

Références bibliographiques

- Finnan, S., J. P. Morrissey, et al. (2004). "Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment." *J Clin Microbiol* **42**(12): 5783-5792.
- Floret, N., X. Bertrand, et al. (2009). "[Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Exogenous or endogenous origin of this bacterium?]." *Pathol Biol* **57**(1): 9-12.
- Fonseca, É. L., V. V. Vieira, et al. (2005). "Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **44**(3): 303-309.
- Gad, G. F., R. A. El-Domany, et al. (2007). "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms." *J Antimicrob Chemother* **60**(5): 1010-1017.
- Galimand, M., P. Courvalin, et al. (2003). "Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(8): 2565-2571.
- Galimand, M., S. Sabtcheva, et al. (2005). "Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7): 2949-2953.
- Galloway, D. R. (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments." *Mol Microbiol* **5**(10): 2315-2321.
- Garber, N., U. Guempel, et al. (1992). "On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose." *Biochim Biophys Acta* **12**(3): 331-333.
- Garcia-Rodriguez, J. A. and R. N. Jones (2002). "Antimicrobial resistance in gram-negative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programme." *J Chemother* **14**(1): 25-32.
- Gaynes, R. and J. R. Edwards (2005). "Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli." *Clin Infect Dis* **41**(6): 848-854.
- Gessard Carle. (1984). "Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages". *Rev Infect Dis* **6**, S775-776.

Références bibliographiques

- Ghanbarzadeh Corehtash, Z., A. Khorshidi, et al. (2015). "Biofilm Formation and Virulence Factors Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients." *Jundishapur Journal of Microbiology* **8**(10).
- Ghuysen, J. M. (1998). "Bacterial resistance to antibiotics, an exemplary model of directed molecular evolution". *Rev Med Liege* **53**(9): 529-531.
- Giannouli, M., F. Tomasone, et al. (2009). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals, *J Antimicrob Chemother.* **63**(4):828-30.
- Gilarranz, R., C. Juan, et al. (2013). "First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Clin Microbiol Infect* **19**(9): 1469-0691.
- Giske, C. G., M. Rylander, et al. (2003). VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden, *Antimicrob Agents Chemother.* **47**(9):3034-5.
- Giwerzman, B., E. T. Jensen, et al. (1991). "Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm." *Antimicrob Agents Chemother* **35**(5): 1008-1010.
- Glupczynski, Y., P. Bogaerts, et al. (2010). "Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals." *J Antimicrob Chemother* **65**(5): 866-871.
- Gotoh, N., N. Itoh, et al. (1994). "Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: evidence of involvement in multiple antibiotic resistance." *FEMS Microbiol Lett* **122**(3): 267-273.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, et al. (1998). "Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(8): 1938-1943.
- Grishin, A. V., M. S. Krivozubov, et al. (2015). "*Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials." *Acta Naturae* **7**(2): 29-41.
- Gupta, S. K., B. R. Padmanabhan, et al. (2014). "ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(1): 212-220.
- Hahn, H., P. M. Lane-Bell, et al. (1997). "Pilin-based anti-*Pseudomonas* vaccines: latest developments and perspectives." *Behring Inst Mitt* **98**: 315-325.

Références bibliographiques

- Hahn, H. P. (1997). "The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review." *Gene* **192**(1): 99-108.
- Hakenbeck, R. and J. Coyette (1998). "Resistant penicillin-binding proteins." *Cell Mol Life Sci* **54**(4): 332-340.
- Hall, L. M., D. M. Livermore, et al. (1993). "OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **37**(8): 1637-1644.
- Hammami, S., I. Boutiba-Ben Boubaker, et al. (2011). "Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation unit." *Diagn Pathol* **6**(106): 1746-1596.
- Hammami, S., V. Gautier, et al. (2010). "Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis." *Clin Microbiol Infect* **16**(2): 189-193.
- Hammami, S., R. Ghazzi, et al. (2009). "Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital." *Pathologie Biologie* **57**(7-8): 530-535.
- Hamood, A. N., J. Griswold, et al. (1996). "Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **64**(8): 3154-3160.
- Hancock, R. E. and F. S. Brinkman (2002). "Function of pseudomonas porins in uptake and efflux." *Annu Rev Microbiol* **56**: 17-38.
- Hancock, R. E. and D. P. Speert (2000). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment." *Drug Resist Updat* **3**(4): 247-255.
- Harbottle, H., S. Thakur, et al. (2006). "Genetics of antimicrobial resistance." *Anim Biotechnol* **17**(2): 111-124.
- Hauser, A. R., E. Cobb, et al. (2002). "Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*." *Crit Care Med* **30**.
- Hauser, A. R., P. J. Kang, et al. (1998). "PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence." *Mol Microbiol* **27**(4): 807-818.
- Heck, L. W., P. G. Alarcon, et al. (1990). "Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase." *J Immunol* **144**(6): 2253-2257.
- Hermann, T. (2007). "Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches." *Cell Mol Life Sci* **64**(14): 1841-1852.

Références bibliographiques

- Heydorn, A., B. Ersboll, et al. (2002). "Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression." *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 2008-2017.
- Hidalgo, L., K. L. Hopkins, et al. (2013). "Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK." *J Antimicrob Chemother* **68**(7): 1543-1550.
- Hocquet, D., P. Plesiat, et al. (2010). "Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8): 3512-3515.
- Hocquet, D., M. Roussel-Delvallez, et al. (2007). MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin, *Antimicrob Agents Chemother*. **51**(4):1582-3.
- Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, et al. (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature* **436**(7054): 1171-1175.
- Hoiby, N., T. Bjarnsholt, et al. (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **35**(4): 322-332.
- Hoiby, N., O. Ciofu, et al. (2011). "The clinical impact of bacterial biofilms." *Int J Oral Sci* **3**(2): 55-65.
- Holder, I. A. (1985). "The pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa* using the burned mouse model: experimental studies from the Shriners Burns Institute, Cincinnati." *Can J Microbiol* **31**(4): 393-402.
- Hong, Y. Q. and B. Ghebrehwet (1992). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3." *Clin Immunol Immunopathol* **62**(2): 133-138.
- Hsiao, K.-Y., M.-F. Lee, et al. (2014). "Detection and characterization of class 1 integron-associated gene cassettes from *Pseudomonas aeruginosa* isolates in southern Taiwan." *Biomarkers and Genomic Medicine* **6**(2): 74-78.
- Huang, H., D. Jeanteur, et al. (1995). "Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD." *Mol Microbiol* **16**(5): 931-941.

Références bibliographiques

- Hunter, R. C., V. Klepac-Ceraj, et al. (2012). "Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity." *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(6): 738-745.
- Iglewski, B. H. and J. C. Sadoff (1979). "Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A." *Methods Enzymol* **60**: 780-793.
- Iraz, M., A. O. Duzgun, et al. (2014). "Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **78**(3): 292-294.
- Ito, A., A. Taniuchi, et al. (2009). "Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms." *Appl Environ Microbiol* **75**(12): 4093-4100.
- Jabalumeli, F., A. Mirsalehian, et al. (2012). "Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients." *Burns* **38**(8): 1192-1197.
- Jacobs, C., L. J. Huang, et al. (1994). "Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction." *Embo J* **13**(19): 4684-4694.
- Jacobson, R. K., N. Minenza, et al. (2012). VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa, *J Antimicrob Chemother.* **67**(7):1797-8.
- Jacoby, G. A., J. Strahilevitz, et al. (2015). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, American Society of Microbiology.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, et al. (2006). "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(4): 1178-1182.
- Jácome, P. R. L. d. A., L. R. Alves, et al. (2012). "Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**: 707-712.
- Jain, M., D. Ramirez, et al. (2004). "Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **42**(11): 5229-5237.

Références bibliographiques

- Janvier, F., K. Jeannot, et al. (2013). "Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(7): 3408-3411.
- Jeannot, K., D. Fournier, et al. (2013). "Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase SHV-2a." *J Clin Microbiol* **51**(2): 673-675.
- Jeannot, K. and P. Plésiat. (2016). "Épidémiologie de la résistance aux β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal des Anti-infectieux*.
- Jeong, S. H., I. K. Bae, et al. (2006). "Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea." *J Microbiol* **44**(4): 423-431.
- Jones, M. E., E. Peters, et al. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria, *Lancet*. **349**(9067):1742-3.
- Joo, H. S. and M. Otto (2012). "Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens." *Chem Biol* **19**(12): 1503-1513.
- Jovicic, B., Z. Lepsanovic, et al. (2011). "Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(8): 3929-3931.
- Juan, C., A. Beceiro, et al. (2008). "Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(10): 3589-3596.
- Jung, G. B., S. W. Nam, et al. (2014). "Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis." *Biomed Opt Express* **5**(9): 3238-3251.
- Kalai Blagui, S., W. Achour, et al. (2007). "Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia." *Clin Microbiol Infect* **13**(8): 794-800.
- Kalai, S., W. Jouaihia, et al. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa*: a multicentric study of antibiotic resistance (1999-2000)." *Tunis Med* **82**(12): 1070-1074.
- Kaplan, J. B. (2011). "Antibiotic-induced biofilm formation." *Int J Artif Organs* **34**(9): 737-751.
- Karatan, E. and P. Watnick (2009). "Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms." *Microbiol Mol Biol Rev* **73**(2): 310-347.

Références bibliographiques

- Karatuna, O. and A. Yagci (2010). "Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates." *Clin Microbiol Infect* **16**(12): 1770-1775.
- Karimi, H., S. A. Motevalian, et al. (2014). "Epidemiology of outpatient burns in Iran: an update." *Ann Burns Fire Disasters* **27**(3): 115-120.
- Khoramrooz, S. S., A. Sharifi, et al. (2016). "High Frequency of Class 1 Integrons in *Escherichia coli* Isolated From Patients With Urinary Tract Infections in Yasuj, Iran." *Iranian Red Crescent Medical Journal* **18**(1): e26399.
- Kim, J., H. D. Park, et al. (2012). "Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation." *Molecules* **17**(8): 9818-9834.
- Kim, J. Y., Y. J. Park, et al. (2008). "Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study." *J Antimicrob Chemother* **62**(3): 479-483.
- Kim, S. G., Y. H. Yoon, et al. (2012). "Effect of furanone on experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation: In vitro study." *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **76**(11): 1575-1578.
- Kipnis, E., T. Sawa, et al. (2006). "Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis." *Med Mal Infect* **36**(2): 78-91.
- Klausen, M., A. Heydorn, et al. (2003). "Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants." *Mol Microbiol* **48**(6): 1511-1524.
- Kohler, T., L. K. Curty, et al. (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." *J Bacteriol* **182**(21): 5990-5996.
- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, et al. (1997). "Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(11): 2540-2543.
- Kolayli, F., G. Gacar, et al. (2005). "PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp." *FEMS Microbiol Lett* **249**(2): 241-245.
- Kotsakis, S. D., C. C. Papagiannitsis, et al. (2010). "GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(3): 1331-1333.
- Ktari, S., G. Arlet, et al. (2006). "Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum

Références bibliographiques

- beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12): 4198-4201.
- Ktari, S., B. Mnif, et al. (2011). "Diversity of beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals." *Microb Drug Resist* **17**(1): 25-30.
- Labuschagne Cde, J., G. F. Weldhagen, et al. (2008). "Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa." *Int J Antimicrob Agents* **31**(6): 527-530.
- Lagatolla, C., E. A. Tonin, et al. (2004). "Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital." *Emerg Infect Dis* **10**(3): 535-538.
- Lam, M. Y., E. J. McGroarty, et al. (1989). "Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Clin Microbiol* **27**(5): 962-967.
- Lamont, I. L., P. A. Beare, et al. (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7072-7077.
- Landman, D., S. Bratu, et al. (2005). "Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B." *J Antimicrob Chemother* **55**(6): 954-957.
- Lang, A. B., M. P. Horn, et al. (2004). "Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients." *Vaccine* **6**(22): S44-48.
- Lau, G. W., D. J. Hassett, et al. (2004). "The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection." *Trends Mol Med* **10**(12): 599-606.
- Lau, G. W., H. Ran, et al. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice." *Infect Immun* **72**(7): 4275-4278.
- Laughlin, R. S., M. W. Musch, et al. (2000). "The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis." *Ann Surg* **232**.
- Laurettil, L., M. L. Riccio, et al. (1999). "Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(7): 1584-1590.

Références bibliographiques

- Lazdunski, A. (2003). "[*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]." *Ann Fr Anesth Reanim* **22**(6): 523-526.
- Lee, J. Y. and K. S. Ko (2012). "OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea." *Int J Antimicrob Agents* **40**(2): 168-172.
- Lee, J. Y., J. H. Song, et al. (2011). "Identification of nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced colistin susceptibility in Korea." *Microb Drug Resist* **17**(2): 299-304.
- Lee, K., Y. S. Lim, et al. (2003). "Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp." *J Clin Microbiol* **41**(10): 4623-4629.
- Lee, S., Y. J. Park, et al. (2005). "Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea." *J Antimicrob Chemother* **56**(1): 122-127.
- Lee, V. T., R. S. Smith, et al. (2005). "Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection." *Infect Immun* **73**(3): 1695-1705.
- Legakis, N. J., L. S. Tzouveleki, et al. (1995). "*Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals. Dissemination of plasmids encoding an SHV-5 type beta-lactamase." *J Hosp Infect* **31**(3): 177-187.
- Lequette, Y. and E. P. Greenberg (2005). "Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *J Bacteriol* **187**(1): 37-44.
- Levesque, C., L. Piche, et al. (1995). "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(1): 185-191.
- Lewis, K. (2012). "Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance." *Handb Exp Pharmacol* **211**: 121-133.
- Li, H., Y. F. Luo, et al. (2012). "Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies." *Int J Med Microbiol* **302**(2): 63-68.
- Li, X. Z., H. Nikaido, et al. (1995). "Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(9): 1948-1953.
- Li, X. Z., P. Plesiat, et al. (2015). "The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria." *Clin Microbiol Rev* **28**(2): 337-418.

Références bibliographiques

- Li, X. Z., L. Zhang, et al. (1998). "Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance." *J Bacteriol* **180**(11): 2987-2991.
- Li, Y., T. Mima, et al. (2003). "A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **52**(4): 572-575.
- Li, Y., O. E. Petrova, et al. (2014). "BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS Pathog* **10**(6).
- Libisch, B., C. G. Giske, et al. (2008). "Identification of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain." *J Clin Microbiol* **46**(5): 1878-1880.
- Libisch, B., M. Muzslay, et al. (2006). "Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12): 4220-4223.
- Libisch, B., J. Watine, et al. (2008). "Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary." *Res Microbiol* **159**(3): 162-168.
- Linares, J. F., I. Gustafsson, et al. (2006). "Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19484-19489.
- Lionelli, G. T., E. J. Pickus, et al. (2005). "A three decade analysis of factors affecting burn mortality in the elderly." *Burns* **31**(8): 958-963.
- Lister, P. D., D. J. Wolter, et al. (2009). "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." *Clin Microbiol Rev* **22**(4): 582-610.
- Liu, P. V. (1974). "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Infect Dis* **130**(0): S94-99.
- Livermore, D. M. (1992). "Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **36**(9): 2046-2048.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 557-584.
- Livermore, D. M. (2002). "Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?" *Clin Infect Dis* **34**(5): 634-640.

Références bibliographiques

- Llanes, C., C. Neuwirth, et al. (2006). "Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase." *Clin Microbiol Infect* **12**(3): 270-278.
- Lodge, J. M., S. D. Minchin, et al. (1990). "Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase." *Biochem J* **272**(3): 627-631.
- Lokrou, A., T. Angnès Memel, et al. (2013). "Bactériologie du pied diabétique en Côte-d'Ivoire." *Médecine des Maladies Métaboliques* **7**(5): 477-481.
- Luzzaro, F., J. D. Docquier, et al. (2004). "Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(2): 648-650.
- Luzzaro, F., E. Mantengoli, et al. (2001). "Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase." *J Clin Microbiol* **39**(5): 1865-1870.
- Lynn, W. A. and D. T. Golenbock (1992). "Lipopolysaccharide antagonists." *Immunol Today* **13**(7): 271-276.
- Maghsoudi, H., A. Pourzand, et al. (2005). "Etiology and outcome of burns in Tabriz, Iran. An analysis of 2963 cases." *Scand J Surg* **94**(1): 77-81.
- Mah, T. F., B. Pitts, et al. (2003). "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance." *Nature* **426**(6964): 306-310.
- Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, et al. (1994). "Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis." *Infect Immun* **62**(2): 596-605.
- Majtan, V., A. Hostacka, et al. (2002). "Toxinogenicity and markers of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with tumor diseases." *Folia Microbiol* **47**(4): 445-449.
- Mansour, W., S. Dahmen, et al. (2009). "Emergence of SHV-2a extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia." *Microb Drug Resist* **15**(4): 295-301.
- Mansour, W., L. Poirel, et al. (2009). "Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia." *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**(4): 458-461.

Références bibliographiques

- Marchandin, H., H. Jean-Pierre, et al. (2000). "Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(1): 213-216.
- Marmouch, H., A. Aouam, et al. (2014). "P116 Diabète et bactéries multirésistantes : analyse de 95 cas." *Diabetes & Metabolism* **40**, **Supplement 1**: A57.
- Maroui, I., A. Barguigua, et al. (2016). "First report of VIM-2 metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Morocco." *Journal of Infection and Chemotherapy* **22**(3): 127-132.
- Maroui, I., A. BELHAJ, et al. (2016). Virulence profiles of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Central Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, **10**(14), 473-480.
- Marr, A. K., J. Overhage, et al. (2007). "The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility." *Microbiology* **153**(2): 474-482.
- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, et al. (1998). "Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds." *J Antimicrob Chemother* **42**(6): 689-696.
- Masuda, N., E. Sakagawa, et al. (1995). "Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(3): 645-649.
- Masuda, N., E. Sakagawa, et al. (2000). "Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(12): 3322-3327.
- Mathur, T., S. Singhal, et al. (2006). "Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods." *Indian J Med Microbiol* **24**(1): 25-29.
- Mattick, J. S. (2002). "Type IV pili and twitching motility." *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.
- Mavroidi, A., A. Tsakris, et al. (2000). Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece, *J Antimicrob Chemother.* **46**(6):1041-2.

Références bibliographiques

- Mavroidi, A., E. Tzelepi, et al. (2001). "An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1." *J Antimicrob Chemother* **48**(5): 627-630.
- Mazzariol, A., C. Mammina, et al. (2011). "A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit." *Clinical Microbiology and Infection* **17**(5): 722-724.
- McClure, C. D. and N. L. Schiller (1996). "Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo." *Curr Microbiol* **33**(2): 109-117.
- Mendes, R. E., M. Castanheira, et al. (2004). First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(4):1433-4.
- Meradi, L., A. Djahoudi, et al. (2011). "Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie." *Pathologie Biologie* **59**(4): 73-78.
- Meradji, S., A. Barguigua, et al. (2016). "Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria." *Burns* **42**(4): 906-918.
- Mérens, A., H. Delacour, et al. (2011). "Pseudomonas aeruginosa et résistance aux antibiotiques." *Revue Francophone des Laboratoires* (435): 49-62.
- Mérens, A., F. Janvier, et al. (2012). "Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*." *Revue Francophone des Laboratoires* (445): 59-74.
- Mesaros, N., P. Nordmann, et al. (2007). "Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium." *Clin Microbiol Infect* **13**(6): 560-578.
- Mesli, E., M. Berrazeg, et al. (2013). "Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria." *Int J Infect Dis* **17**(9): 16.
- Miller, G. H., F. J. Sabatelli, et al. (1997). "The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups." *Clin Infect Dis* **24**(1): S46-62.

Références bibliographiques

- Minchella, A., L. Molinari, et al. (2010). "Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006." *Pathologie Biologie* **58**(1): 1-6.
- Miyazaki, S., T. Matsumoto, et al. (1995). "Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice." *J Med Microbiol* **43**(3): 169-175.
- Molin, S. and T. Tolker-Nielsen (2003). "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure." *Curr Opin Biotechnol* **14**(3): 255-261.
- Monds, R. D. and G. A. O'Toole (2009). "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review." *Trends Microbiol* **17**(2): 73-87.
- Monroe, D. (2007). "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." *PLoS Biol* **5**(11).
- Mugnier, P., I. Casin, et al. (1998). "Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(12): 3113-3116.
- Mugnier, P., P. Dubrous, et al. (1996). "A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(11): 2488-2493.
- Mugnier, P., I. Podglajen, et al. (1998). "Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **144**(Pt 4): 1021-1031.
- Mulcahy, L. R., J. L. Burns, et al. (2010). "Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis." *J Bacteriol* **192**(23): 6191-6199.
- Mulcahy, L. R., V. M. Isabella, et al. (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease." *Microb Ecol* **68**(1): 1-12.
- Naas, T., R. A. Bonnin, et al. (2013). "Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **68**(8): 1757-1762.
- Naas, T., L. Philippon, et al. (1999). "An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1281-1284.
- Naas, T., L. Poirel, et al. (1999). "Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol Lett* **176**(2): 411-419.

Références bibliographiques

- Naas, T., W. Sougakoff, et al. (1998). "Molecular characterization of OXA-20, a novel class D beta-lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(8): 2074-2083.
- Nakajima, A., Y. Sugimoto, et al. (2002). "High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation." *Microbiol Immunol* **46**(6): 391-395.
- Neonakis, I. K., E. V. Scoulica, et al. (2003). "Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12." *Microb Drug Resist* **9**(2): 161-165.
- Nikaido, H. (1996). "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **178**(20): 5853-5859.
- Nikaido, H., K. Nikaido, et al. (1991). "Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **266**(2): 770-779.
- Noppe-Leclercq, I., F. Wallet, et al. (1999). "PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*." *Res Microbiol* **150**(5): 317-322.
- Nordmann, P. (2003). "Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*." *Ann Fr Anesth Reanim* **22**(6): 527-530.
- Nordmann, P. and M. Guibert (1998). "Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **42**(2): 128-131.
- Nordmann, P. and T. Naas (1994). "Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **38**(1): 104-114.
- Nordmann, P. and L. Poirel (2002). "Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes." *Clin Microbiol Infect* **8**(6): 321-331.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Mol Microbiol* **30**(2): 295-304.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis." *Mol Microbiol* **28**.
- Ocampo-Sosa, A. A., G. Cabot, et al. (2012). "Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

Références bibliographiques

- patients with bacteremia in a Spanish multicenter study." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(4): 1703-1713.
- Olejnickova, K. and V. Hola (2012). "[The comparison of selected virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* catheter isolates]." *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **61**(1-2): 21-28.
- Oliveira, A. and L. Cunha Mde (2010). "Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci." *BMC Res Notes* **3**(260): 1756-0500.
- Oliver, K. E. and L. Silo-Suh (2013). "Impact of D-amino acid dehydrogenase on virulence factor production by a *Pseudomonas aeruginosa*." *Can J Microbiol* **59**(9): 598-603.
- Oteo, J., C. Navarro, et al. (2006). "Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions." *J Clin Microbiol* **44**(7): 2359-2366.
- Over, U., D. Gur, et al. (2001). "The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey." *Clin Microbiol Infect* **7**(9): 470-478.
- Ozgumus, O. B., R. Caylan, et al. (2007). "Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey." *Microb Drug Resist* **13**(3): 191-198.
- Park, P. W., K. Biedermann, et al. (1996). "Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation." *J Invest Dermatol* **106**(5): 1075-1080.
- Parsek, M. R. and T. Tolker-Nielsen (2008). "Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Curr Opin Microbiol* **11**(6): 560-566.
- Patzer, J., M. A. Toleman, et al. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001)." *J Antimicrob Chemother* **53**(3): 451-456.
- Peleg, A. Y., J. M. Bell, et al. (2006). Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes, *J Antimicrob Chemother.* **57**(4):794-5.
- Périchon, B., P. Bogaerts, et al. (2008). "Sequence of Conjugative Plasmid pIP1206 Mediating Resistance to Aminoglycosides by 16S rRNA Methylation and to Hydrophilic Fluoroquinolones by Efflux." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(7): 2581-2592.

Références bibliographiques

- Petropoulou, D., K. Tzanetou, et al. (2006). "Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures." *Microb Drug Resist* **12**(1): 39-43.
- Philippon, L. N., T. Naas, et al. (1997). "OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2188-2195.
- Piddock, L. J. (2006). "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." *Clin Microbiol Rev* **19**(2): 382-402.
- Pier, G. B. (2003). "Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen." *Carbohydr Res* **338**(23): 2549-2556.
- Pitout, J. D., G. Revathi, et al. (2008). "Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya." *Clin Microbiol Infect* **14**(8): 755-759.
- Poirel, L., A. Benouda, et al. (2011). "Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco." *J Antimicrob Chemother* **66**(12): 2781-2783.
- Poirel, L., L. Brinas, et al. (2005). "Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(8): 3593-3597.
- Poirel, L., P. Gerome, et al. (2002). "Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(2): 566-569.
- Poirel, L., D. Girlich, et al. (2001). "OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 447-453.
- Poirel, L., A. Karim, et al. (1999). Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France, *J Antimicrob Chemother.* **43**(1):157-8.
- Poirel, L., I. Le Thomas, et al. (2000). "Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3): 622-632.
- Poirel, L., E. Lebessi, et al. (2004). "Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2277-2279.

Références bibliographiques

- Poirel, L., O. Menuteau, et al. (2003). "Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital." *J Clin Microbiol* **41**(8): 3542-3547.
- Poirel, L., T. Naas, et al. (2000). "Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(4): 891-897.
- Poirel, L., G. F. Weldhagen, et al. (2002). "A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa." *J Antimicrob Chemother* **49**(3): 561-565.
- Poirel, L., G. F. Weldhagen, et al. (2001). "GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(9): 2598-2603.
- Pollini, S., S. Maradei, et al. (2013). "FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(1): 410-416.
- Poole, K. (2001). "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(2): 255-264.
- Poole, K. (2005). "Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 479-487.
- Poole, K. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max." *Front Microbiol* **2**(65).
- Poole, K., K. Krebs, et al. (1993). "Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon." *J Bacteriol* **175**(22): 7363-7372.
- Poole, K., K. Tetro, et al. (1996). "Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(9): 2021-2028.
- Pournaras, S., M. Maniati, et al. (2003). "Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants *blaVIM-2* and *blaVIM-4*." *J Antimicrob Chemother* **51**(6): 1409-1414.
- Pournaras, S., A. Tsakris, et al. (2002). "Novel variant *blaVIM-4* of the metallo-beta-lactamase gene *blaVIM-1* in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(12): 4026-4028.

Références bibliographiques

- Queenan, A. and K. Bush (2007). "Carbapenemases: the versatile beta-lactamases." *Clinical Microbiology Reviews* **20**(3): 440 - 458.
- Quinn, J. P., E. J. Dudek, et al. (1986). "Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections." *J Infect Dis* **154**(2): 289-294.
- Rada, B., M. A. Jendrysik, et al. (2013). "Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase." *PLoS One* **8**(1): 14.
- Rada, B. and T. L. Leto (2013). "Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections." *Trends Microbiol* **21**(2): 73-81.
- Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." *Drug Resist Updat* **13**(6): 151-171.
- Ranellou, K., K. Kadlec, et al. (2012). "Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in Greece." *J Antimicrob Chemother* **67**(2): 357-361.
- Read, R. C., P. Roberts, et al. (1985). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating." *J Appl Physiol* **72**(6): 2271-2277.
- Renner, L. D. and D. B. Weibel (2011). "Physicochemical regulation of biofilm formation." *MRS Bull* **36**(5): 347-355.
- Riccio, M. L., L. Pallecchi, et al. (2005). "Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo--lactamase from different Italian hospitals." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(1): 104-110.
- Riera, E., G. Cabot, et al. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem." *J Antimicrob Chemother* **66**(9): 2022-2027.
- Rio, Y., P. Pina, et al. (2002). "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics isolated from patients of intensive care units in France in 1998. Resistant phenotypes to beta-lactams." *Pathol Biol* **50**(1): 12-17.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." *Nat Med* **12**(1): 83-88.
- Robin, F., N. Aggoune-Khinache, et al. (2010). "Novel VIM Metallo- β -Lactamase Variant from Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Algeria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**(1): 466-470.

Références bibliographiques

- Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, et al. (1999). "Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(3): 523-553.
- Rolain, J. M., R. Canton, et al. (2012). "Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm." *Clin Microbiol Infect* **18**(7): 615-616.
- Rossolini, G. M., F. Luzzaro, et al. (2008). "First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(11): 4023-4029.
- Rossolini, G. M. and E. Mantengoli (2005). "Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*." *Clin Microbiol Infect* **4**: 17-32.
- Ruiz-Martínez, L., L. López-Jiménez, et al. (2011). "Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *International Journal of Antimicrobial Agents* **38**(5): 398-402.
- Rybtke, M., L. D. Hultqvist, et al. (2015). "*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response." *J Mol Biol* **427**(23): 3628-3645.
- Sabir, R., S. F. Alvi, et al. (2014). "Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes." *Pak J Med Sci* **30**(4): 814-818.
- Sadovskaya, I., J. R. Brisson, et al. (1998). "Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5." *Eur J Biochem* **255**(3): 673-684.
- Sandberg, M. E., D. Schellmann, et al. (2009). "Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay." *J Microbiol Methods* **78**(1): 104-106.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sardelic, S., L. Pallecchi, et al. (2003). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia, *Emerg Infect Dis*. **9**(8):1022-3.
- Sardelic, S., B. Bedenic, et al. (2012). "Infrequent finding of metallo-beta-lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(5): 2746-2749.

Références bibliographiques

- Satake, S., H. Yoneyama, et al. (1991). "Role of OmpD2 and chromosomal beta-lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **28**(2): 199-207.
- Sato, H., J. B. Feix, et al. (2005). "Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU." *J Bacteriol* **187**(3): 1192-1195.
- Sauer, K., A. K. Camper, et al. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm." *J Bacteriol* **184**(4): 1140-1154.
- Sayner, S. L., D. W. Frank, et al. (2004). "Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY." *Circ Res* **95**(2): 196-203.
- Schaber, J. A., W. J. Triffo, et al. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling." *Infect Immun* **75**(8): 3715-3721.
- Schultz, M. J., A. W. Rijneveld, et al. (2001). "Impairment of host defence by exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice." *J Med Microbiol* **50**(9): 822-827.
- Sefraoui, I., M. Berrazeg, et al. (2014). "Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012." *Microb Drug Resist* **20**(2): 156-161.
- Shakil, S., R. Khan, et al. (2008). "Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground." *J Biomed Sci* **15**(1): 5-14.
- Shaver, C. M. and A. R. Hauser (2004). "Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung." *Infect Immun* **72**.
- Shrout, J. D., D. L. Chopp, et al. (2006). "The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional." *Mol Microbiol* **62**(5): 1264-1277.
- Shrout, J. D., T. Tolker-Nielsen, et al. (2011). "The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation." *MRS Bull* **36**(5): 367-373.
- Siah, S., R. Belefqih, et al. (2009). "L'Infection Nosocomiale en Réanimation des Brûlés." *Annals of Burns and Fire Disasters* **22**(2): 72-78.
- Siarkou, V. I., D. Vitti, et al. (2009). "Molecular epidemiology of outbreak-related *pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(4): 1325-1330.

Références bibliographiques

- Simoes, M. (2011). "Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms." *Curr Med Chem* **18**(14): 2129-2145.
- Simpson, D. A., R. Ramphal, et al. (1992). "Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence: distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins." *Infect Immun* **60**(9): 3771-3779.
- Sirot, D., J. Sirot, et al. (1987). "Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase." *J Antimicrob Chemother* **20**(3): 323-334.
- Soberon-Chavez, G., M. Aguirre-Ramirez, et al. (2005). "The *Pseudomonas aeruginosa* RhIA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production." *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**(11-12): 675-677.
- Soberon-Chavez, G., F. Lepine, et al. (2005). "Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(6): 718-725.
- Sommerfeld Ross, S. and J. Fiegel (2012). "Nutrient dispersion enhances conventional antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **40**(2): 177-181.
- Stehling, E. G., W. D. Silveira, et al. (2008). "Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections." *Braz J Infect Dis* **12**(1): 86-88.
- Stonehouse, M. J., A. Cota-Gomez, et al. (2002). "A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C." *Mol Microbiol* **46**(3): 661-676.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-964.
- Strateva, T., V. Ouzounova-Raykova, et al. (2007). "Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria." *J Chemother* **19**(2): 140-145.
- Strateva, T. and D. Yordanov (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance." *J Med Microbiol* **58**(Pt 9): 1133-1148.
- Takase, H., H. Nitandai, et al. (2000). "Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice." *Infect Immun* **68**(4): 1834-1839.
- Talon, D. (1999). "The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria." *J Hosp Infect* **43**(1): 13-17.

Références bibliographiques

- Talon, D., V. Cailleaux, et al. (1996). "Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Hosp Infect* **32**(2): 135-145.
- Tang, H. B., E. DiMango, et al. (1996). "Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection." *Infect Immun* **64**(1): 37-43.
- Tenke, P., B. Koves, et al. (2012). "Update on biofilm infections in the urinary tract." *World J Urol* **30**(1): 51-57.
- Thibodeau, P. H. and M. B. Butterworth (2013). "Proteases, cystic fibrosis and the epithelial sodium channel (ENaC)." *Cell Tissue Res* **351**(2): 309-323.
- Tielker, D., S. Hacker, et al. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." *Microbiology* **151**(Pt 5): 1313-1323.
- Tingpej, P., L. Smith, et al. (2007). "Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **45**(6): 1697-1704.
- Toder, D. S., S. J. Ferrell, et al. (1994). "*lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity." *Infect Immun* **62**(4): 1320-1327.
- Toleman, M. A., D. Biedenbach, et al. (2003). "Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *blaIMP-13*, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme." *J Antimicrob Chemother* **52**(4): 583-590.
- Tote, K., D. Vanden Berghe, et al. (2008). "A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms." *Lett Appl Microbiol* **46**(2): 249-254.
- Touati, A., S. Benallaoua, et al. (2006). "First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria." *Int J Antimicrob Agents* **27**(5): 397-402.
- Touati, A., L. Brasme, et al. "First report of *qnrB* producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **60**(3): 287-290.
- Touati, M., S. M. Diene, et al. (2013). Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria, *Antimicrob Agents Chemother*.57(5):2426-7.

Références bibliographiques

- Trautmann, M., T. Michalsky, et al. (2001). "Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients." *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**(1): 49-52.
- Trias, J. and H. Nikaido (1990). "Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides." *J Biol Chem* **265**(26): 15680-15684.
- Tsakris, A., S. Pournaras, et al. (2000). "Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece." *J Clin Microbiol* **38**(3): 1290-1292.
- Tumeo, E., H. Gbaguidi-Haore, et al. (2008). "Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents?" *Int J Hyg Environ Health* **211**(1-2): 200-204.
- Vahaboglu, H., F. Coskuncan, et al. (2001). "Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains." *J Med Microbiol* **50**(7): 642-645.
- Vahaboglu, H., R. Ozturk, et al. (1997). "Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(10): 2265-2269.
- Vallet, I., J. W. Olson, et al. (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6911-6916.
- Van Alst, N. E., M. Wellington, et al. (2009). "Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **77**(10): 4446-4454.
- Vatcheva-Dobrevska, R., X. Mulet, et al. (2013). "Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals." *Microb Drug Resist* **19**(5): 355-361.
- Vettoretti, L., N. Floret, et al. (2009). "Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**(10): 1217-1222.
- Viedma, E., C. Juan, et al. (2009). "Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-

Références bibliographiques

- lactamases GES-1 and GES-5 in Spain." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(11): 4930-4933.
- Viedma, E., C. Juan, et al. (2012). "VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain." *Emerg Infect Dis* **18**(8): 1235-1241.
- Vogne, C., J. R. Aires, et al. (2004). "Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1676-1680.
- Vora, S. and R. Auckenthaler (2009). "What is the significance of extended spectrum betalactamases in clinical practice?." *Rev Med Suisse* **5**(220): 1991-1994.
- Wachino, J. and Y. Arakawa (2012). "Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update." *Drug Resist Updat* **15**(3): 133-148.
- Wall, D. and D. Kaiser (1999). "Type IV pili and cell motility." *Mol Microbiol* **32**(1): 1-10.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, et al. (2005). "Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?" *Clin Microbiol Rev* **18**(2): 306-325.
- Wang, C. Y., J. S. Jerng, et al. (2006). "Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes." *Clin Microbiol Infect* **12**(1): 63-68.
- Wang, D. D., T. Y. Sun, et al. (2007). "Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin." *Chin Med J* **120**(1): 68-70.
- Wang, S., S. Yu, et al. (2014). "Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Environ Microbiol* **80**(21): 6724-6732.
- Watanabe, M., S. Iyobe, et al. (1991). "Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **35**(1): 147-151.
- Weldhagen, G. F., L. Poirel, et al. (2003). "Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(8): 2385-2392.
- Wick, M. J., D. W. Frank, et al. (1990). "Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A." *Annu Rev Microbiol* **44**: 335-363.
- Williams, E. P. and K. Cameron (1894). "Infection by the *Bacillus Pyocyaneus* a Cause of Infantile Mortality." *Public Health Pap Rep* **20**: 355-360.

Références bibliographiques

- Wimpenny, J., W. Manz, et al. (2000). "Heterogeneity in biofilms." *FEMS Microbiol Rev* **24**(5): 661-671.
- Winzer, K., C. Falconer, et al. (2000). "The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS." *J Bacteriol* **182**(22): 6401-6411.
- Wolska, K. and B. Kot (2013). "Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR." *Acta Microbiol Immunol Hung* **60**(3): 313-328.
- Wong, K. K., K. Poole, et al. (1997). "Influence of OprM expression on multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(9): 2009-2012.
- Woodford, N., M. J. Ellington, et al. (2006). "Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp." *Int J Antimicrob Agents* **27**(4): 351-353.
- Woods, D. E., W. S. Hwang, et al. (1988). "Alteration of pulmonary structure by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S." *J Med Microbiol* **26**(2): 133-141.
- Woods, D. E., M. S. Schaffer, et al. (1986). "Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites." *Journal of Clinical Microbiology* **24**(2): 260-264.
- Wu, Q., Y. Zhang, et al. (2009). "Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(1): 271-272.
- Yakupogullari, Y., L. Poirel, et al. (2008). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey, *J Antimicrob Chemother.* **61**(1):221-2.
- Yamane, K., Y. Doi, et al. (2004). "Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2069-2074.
- Yamane, K., J. Wachino, et al. (2007). "New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(9): 3354-3360.
- Yokoyama, K., Y. Doi, et al. (2003). "Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*." *Lancet* **362**(9399): 1888-1893.
- Yu, F. Y., D. Yao, et al. (2010). "High prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital." *BMC Infect Dis* **10**(184): 1471-2334.

Références bibliographiques

- Zoghlami, A., L. Kanzari, et al. (2012). "Epidemiological profile and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn and traumatology center in Tunisia over a three-year period." *Tunis Med* **90**(11): 803-806.
- Zubair, M., A. Malik, et al. (2011). "Prevalence of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot ulcer patients." *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* **5**(2): 90-92.
- Zuckert, W. R., H. Marquis, et al. (1998). "Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog." *Infect Immun* **66**(10): 4823-4831.

*« On ne fait jamais attention a ce qui a été fait ; on ne voit que ce
qui reste à faire »*

Marie Curie



RESUMES

Résumé

Au cours des dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* s'est imposé comme un pathogène hospitalier majeur, responsable d'un nombre important d'infections remarquables par leur sévérité.

Cette bactérie opportuniste, montre une capacité de résistance à la plupart des antibiotiques utilisés et elle est capable d'infecter un large spectre d'hôtes, sa pathogénicité repose sur un arsenal complexe constitué de facteurs solubles et d'attributs cellulaires.

Un ensemble de 110 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées, entre janvier 2012 et Janvier 2015, au niveau de divers services de trois centres hospitalo-universitaires d'Annaba, en Est Algérien. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes vis-à-vis de 13 antibiotiques dont 7 β -lactamines, 3 aminosides, deux fluoroquinolone, et la colistine, par la méthode des disques selon les normes de l'EUCAST, a révélé l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. 30 (28%) étaient résistantes à l'imipénème (CMI allant de 8 à ≥ 32 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Le gène *blaVIM-2* codant une métallo- β -lactamase a été détecté chez une seule souche alors que le gène *blaVIM-4* a été détecté chez six souches. Les souches résistantes à l'imipénème ont montré la présence de mutations sur le gène *oprD*. La classe 1 des intégrons, qui contenaient la cassette du gène *aadA7*, ont été détectés dans six isolats. Plusieurs gènes de la résistance croisés aux antibiotiques ont été également détectés.

L'analyse des souches par PFGE a montré la présence de divers clones. Les souches appartenant au même clone épidémique présentaient une séquence du gène *oprD* identique. Nous rapportons la première détection en 2015 de métallo- β -lactamase *blaVIM-4* chez les souches de *P. aeruginosa* en Algérie. Nous avons également constaté que les mutations *oprD* étaient le principal mécanisme de la résistance à l'imipénème. Nous rapportant également la première détection du gène de méthylase ARNr 16S, *rmtB*, dans une seule souche.

Une analyse phénotypique des facteurs de virulence a montré qu'un pourcentage élevé de facteurs de virulence (86,6% de ces isolats ont pu produire la protéase; 73,3% des isolats produisaient une DNase; et 66,6% ont été hémolysine positif).

Tous les isolats étaient capables de former un biofilm. Une étude de la cinétique de la production de biofilm a révélé que la production de biofilm augmente lorsque la concentration de l'imipénème ou de la ciprofloxacine et le temps d'incubation a augmenté.

MOTS CLES :

Pseudomonas aeruginosa; Résistance aux antibiotiques ; Facteurs de virulence ; Biofilm

SUMMARY

In recent decades, *Pseudomonas aeruginosa* has emerged as a major hospital pathogen, responsible for a significant number of outstanding infection severities.

This opportunistic bacteria, shows a capacity for resistance to most antibiotics and is cabal of infecting a broad host range, its pathogenicity based on a complex arsenal consisting of soluble factors and cell attributes.

A total of 110 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated between January 2012 and January 2015 from various units of three hospitals from Annaba in east Algeria. The study in vitro of susceptibility of these organisms to 13 antibiotics, including 7 β -lactams, three aminoglycosides, two fluoroquinolones and colistin, revealed the emergence of antibiotics multiresistant strains. 30 (28%) were found to be resistant to imipenem (MICs ranged from 8 to ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$). The *blaVIM-2* gene was detected in one strain while the *blaVIM-4* gene was detected in six strains. The remaining imipenem-resistant isolates showed the presence of *oprD* mutations. The class 1 integrons, which contained the *aadA7* gene cassette, was detected in eight isolates. The PFGE analysis differentiated strains into various clones and the strains from the same clone had an identical sequence of the *oprD* gene. We report the first detection in 2015 of *blaVIM-4* in Algerian *P. aeruginosa* strains. We also found that *oprD* mutations were the major determinant of high-level imipenem resistance. Also are relating the first detection of the methylase gene 16S rRNA *rmtB* in a single strain resistant to imipenem.

Phenotypic analysis of virulence factors has shown that a high percentage of virulence factors (86.6% of these isolates were able to produce protease; 73.3% of isolates has DNase; and 66.6% were haemolysin positive). All isolates were biofilm formers. A study on the kinetics of biofilm production revealed that biofilm production increased when the concentration of imipenem or ciprofloxacin and the incubation time increased.

KEY WORDS:

Pseudomonas aeruginosa; Antibiotics resistance; Virulence factors; Biofilm

ملخص

في العقود الاخيرة برز *Pseudomonas aeruginosa* كجراثومة ممرضة منتشرة أساسا في المستشفيات ومسؤولة عن الإصابة بعدد كبير من الالتهابات الخطيرة.

هذه البكتيريا الانتهازية تظهر قدرة كبيرة على التكيف تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان، قدرتها الامراضية ناتجة عن عدة عوامل تتكون أساسا من عدة سموم يتم انتاجها في الوسط الخارجي بالإضافة إلى عوامل مرتبطة أساسا بالخلية البكتيرية.

مجموع 110 جراثوم من عصيات *P.aeruginosa* تم عزلها ما بين جانفي 2012 وجانفي 2015، في مختلف الوحدات الاستشفائية من ثلاث مستشفيات في الشرق الجزائري. دراسة حساسية هذه الجراثيم إلى 13 مضاد حيوي منهم 7 لكتامين، 3 امينوزيد، 2 فليورو كينولون والكوليستين، نبين ظهور جراثيم متعددة المقاومة للمضادات الحيوية 30(28%) كانت جراثيم مقاومة للايميبينيام ($\text{mics} \geq 16 \text{ ug/ml}$). تم الكشف عن المورثة bla vim-2 التي تشفر الانزيم

ميتالو- β - لاكتاماز في سلالة واحدة بينما تم الكشف عن مورثة أخرى bla vim-4 التي تشفر نفس الانزيم في 6 سلالات أخرى. أظهرت هذه السلالات المقاومة للايميبينيام كذلك وجود طفرات مختلفة في المورثة oprD. تم الكشف أيضا على عدة جينات مسؤولة عن المقاومة لعدة مضادات حيوية أخرى عن هذه السلالات البكتيرية.

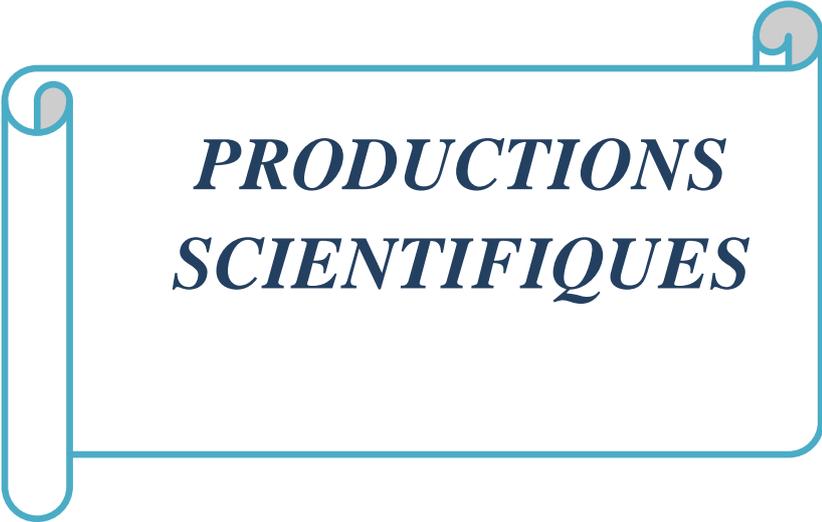
تحليل السلالات بواسطة PFGE اظهر وجود العديد من المستقرات الطبيعية الاستنساخية. كما أظهرت السلالات التي تنتمي إلى نفس النسخة الوبائية وجود سلسلة الجين oprD متطابقة.

هذه الدراسة تمثل الكشف الأول للميتالو- β - لكتاماز، vim-4 في عام 2015 في سلالات *P.aeruginosa* في الجزائر، كما أننا تمكنا من الكشف لأول مرة عن وجود جين ميتيلاز ARNr 16S, rmtB في سلالة واحدة.

وقد اظهر التحليل المظهري لبعض العوامل الممرضة له السلالات وجود نسب عالية (فمثلا 86.6% من هذه السلالات لها القدرة على إنتاج إنزيمات حالة البروتينات 73.3% لها القدرة على إنتاج إنزيمات ADN، كما ان 66.6% لها إنزيمات حالة للدم.

جميع السلالات المدروسة كانت لها القدرة على تشكيل البيوفيلم. كشفت دراسة حركية البيوفيلم في وجود نوعية من المضادات الحيوية (الايميبينيام، سيبروفلوكساسين) ان هناك زيادة في إنتاج البيوفيلم من طرف هذه السلالات كلما زاد تركيز المضادات الحيوية في الوسط.

الكلمات المفتاحية : *Pseudomonas aeruginosa*، مقاومة المضادات الحيوية، العوامل الممرضة، بيوفيلم.



***PRODUCTIONS
SCIENTIFIQUES***

Productions Scientifiques

Liste des articles :

❖ *Articles de la thèse :*

Meradji, S., A. Barguigua, Bentakouk, M. C. Nayme, K. Zerouali, K. Mazouz, D. Chettibi, H. Timinouni, M. (2016). "Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria." *Burns* 42(4): 906-918.

Meradji, S., A. Barguigua, Mazouz, D. Chettibi, H. Timinouni, M. (2015). "Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria." *Antimicrob Resist Infect Control* 4(27): 015-0067.

❖ *Article hors thèse:*

Mellouk, F. Z., S. Bakour, **S. Meradji**, Al-Bayssari C. Bentakouk M. C. Zouyed F. Djahoudi A. Boutefnouchet N. Rolain J. M. (2016). "First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria." *Microb Drug Resist* **17**: 17.

Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria.

Samah Meradji, Abouddihaj Barguigua, Mohamed cherif Bentakouk, Kaotar Nayme, Khalid Zerouali, Dekhil Mazouz, Houria Chettibi, Mohammed Timinouni.

Published in: Volume 42, Issue 4, Pages 906–918

Online Ahead of Print: June 17, 2016

Name of the Journal: Burns

Latest Impact Factor* is 1.95 *2014

Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2016

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/burns

Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria

Samah Meradji^a, Abouddihaj Barguigua^{b,c}, Mohamed cherif Bentakouk^d, Kaotar Nayme^{b,c}, Khalid Zerouali^c, Dekhil Mazouz^e, Houria Chettibi^a, Mohammed Timinouni^{b,*}

^aBiochemistry and Applied Microbiology Laboratory, Badji Mokhtar Faculty of Sciences, Department of Biology, Annaba University, Box 12 Sidi Amar, 23000 Annaba, Algeria

^bMolecular Bacteriology Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco

^cMicrobiology Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, 1 Street Hospital, 20360 Casablanca, Morocco

^dResuscitation Center and Burns Treatment, University Hospital Ibn Rochd, 23000 Annaba, Algeria

^eMicrobiology Laboratory, University Hospital Dorban, 23000 Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 23 February 2016

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Prevalence

Risk factors

VIM

Carbapenem resistance

ABSTRACT

In this study, we investigated the prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) in burn patients from eastern Algeria, CRPA virulence factors and the molecular epidemiology of CRPA. The overall prevalence of CRPA was 48.38%. Seven (46.66%) isolates were metallo- β -lactamases (MBL) producers and contained the MBL genes *bla*_{VIM-4} ($n = 6$) and *bla*_{VIM-2} ($n = 1$). Risk factors for CRPA infection were urinary catheter use and intubation ($p = 0.008$). A high percentage of virulence factors (86.6% of these isolates were able to produce protease; 73.3% of isolates has DNase; and 66.6% were haemolysin positive) was observed in CRPA isolates. Among the seven MBL-producing isolates, four had the same clonal profile. The class 1 integrons, which contained the *aadA7* gene cassette, were detected in six isolates. The 16SrRNA methylase gene, *rmtB*, was detected in one strain. All CRPA isolates were biofilm formers. A study on the kinetics of biofilm production revealed that biofilm production increased when the concentration of imipenem or ciprofloxacin and the incubation time increased. This is the first study to report the presence of VIM-4-producing *P. aeruginosa* from North Africa and also of the high prevalence of CRPA isolates. Based on our study of burn unit patients, the high percentage of *P. aeruginosa* with virulence factors and multi-drug resistance is alarming.

© 2016 Elsevier Ltd and ISBI. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +212 05 22 43 44 50; fax: +212 05 22 26 09 57.

E-mail address: mohammed.timinouni@pasteur.ma (M. Timinouni).

Abbreviations: CRPA, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CSPA, carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*; MBLs, metallo- β -lactamases; MDR, multidrug-resistant; MICs, minimum inhibitory concentrations.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2016.02.023>

0305-4179/© 2016 Elsevier Ltd and ISBI. All rights reserved.

1. Introduction

Burns are an increasing and growing public health problem worldwide especially in developing economies such as Algeria [1]. *Pseudomonas aeruginosa* is a life-menacing nosocomial pathogen that appears as a leading cause of critical infections in burn patients. The treatment of *P. aeruginosa* infections are constantly difficult to treat due to limited susceptibility to antimicrobial drugs and the appearance of antibiotic resistance during therapy. Multidrug resistance, which is engendered by a diversity of resistance mechanisms, leaves insufficient alternatives for treatment in some patients [2].

Carbapenems are selective drugs used for the treatment of multidrug-resistant (MDR) strains [3]. However, the increasing frequency of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) has recently become a serious concern worldwide. Among the mechanisms of acquired resistance to imipenem, Class B metallo- β -lactamases (MBLs) induce resistance to all β -lactams except aztreonam. Worldwide, several types of MBLs have been determined in *P. aeruginosa* isolates (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM and NDM) [4]. Of the MBLs, VIM types are the most frequent [4–7]. The clinically important MBL families VIMs have been reported worldwide, in different geographical areas including Mediterranean region, European countries [5,6] and from African countries [8–10]. Specifically, blaVIM-2 has appeared as the most prominent MBL variant worldwide [5,6,8–10]. Algeria is a northern country in Africa, where recent antibiotic resistance data indicate a worrying situation. Indeed, the last ten years have been marked by the appearance and extended of new resistance genes in particular in northern Africa [8,9]. *P. aeruginosa* is not only one of the most frequent nosocomial pathogen with acquired antimicrobial resistance traits, but it is also a model pathogen with great adaptability and metabolic versatility [11–13]. The pathogenesis of *P. aeruginosa* is multifactorial and dependent on a larger virulence factors. It relies on the following traits of pathogenicity including a complex arsenal of soluble molecules (such as toxins, enzymes and exopolysaccharides) and cellular structures (such as pili and secretion systems) with complementary effects and the production of virulence factors depends on multiple regulation circuits [14,15]. Among the numerous of virulence determinants of *P. aeruginosa*, biofilm formation is the most important because it is strongly correlated with resistance to antibiotic chemotherapy [16–18]. The high resistance and tolerance of biofilm embedded bacteria which can be 1000-fold more resistant to antibiotics than planktonic cells to virtually any antimicrobial is related to several factors or combinations of factors. These include restricted penetration of antimicrobials into a biofilm, decreased growth rate, and expression of several resistance genes [16]. Considering that the biofilm is a critical factor for the efficacy of antimicrobials and the spread of drug resistance, our first aim was to determine to the prevalence of *P. aeruginosa* isolated from burn unit patients from Ibn Sina Annaba hospital in eastern Algeria and determine the molecular characteristics of various strains and to determine risk factors related with imipenem resistance and virulence factors. Our second aim was to assess the effect of imipenem and ciprofloxacin on *P. aeruginosa* biofilm formation, which

can conduct to strategies for the prevention and investigation of *P. aeruginosa* treatment.

2. Material and methods

2.1. Setting

The study was performed at a state-wide adult burns service unit located at Ibn Sina Annaba Hospital (279 beds) affiliated with a tertiary referral centre in Annaba University Hospital (Annaba city, eastern Algeria).

2.2. Ethics

Ethics approval was obtained from the hospital's human research and ethics committee.

2.3. Data collection

Between April 2014 and January 2015 we prospectively enrolled all patients admitted to the Department of Burns at Annaba University Hospital in Algeria. All the patients infected with *P. aeruginosa* were included in the study. Demographic features, clinical conditions during hospitalization and concomitant diseases of the included patients were retrospectively reviewed and analyzed.

Demographic and clinical information were obtained from the patient medical record, including gender, age, duration of hospitalization, burn cause and degree, comorbidities (previous surgical interventions, presence of chronic pulmonary, cardiac, diabetes mellitus, central nervous system and other diseases), use of invasive devices, previous antibiotic use, and previous hospitalizations.

The analysis was limited to the first episode. According to the Center for Disease Control criteria, a nosocomial infection was considered if the infection was not evident until >48 h of hospitalization [19]. Previous hospitalization was defined as an inpatient stay at Annaba University hospital or another hospital for at least 2 days during the 3 months preceding the index hospitalization.

Prior antibiotic exposure was defined as the exposure to antimicrobial agents for at least 3 consecutive days within three months of the isolation of the organism onset. The following classes of antibiotics were recorded: aminoglycosides, carbapenems, third-generation cephalosprins, fluoroquinolone, and macrolide.

2.4. Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial drug susceptibility was determined using the disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to recommendations from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) [20]. Thirteen antibiotics were tested, including ticarcillin, ceftriaxon, piperacillin, cefepime, ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidim, imipenem, aztreonam, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, and colistin. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a wild-type susceptible control.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem were determined using Etest-strips (AB BioMerieux, France), as described by the manufacturer's instructions.

2.5. Phenotypic detection of carbapenemase production

Carbapenemase production was detected phenotypically using a modified Hodge test by using an imipenem disc (10 µg) as described by the CLSI [20]. The detection of metallo-β-lactamase production was also performed by the combined-disc test using two imipenem discs one (10 µg per disc), and another disc containing 10 µL of 0.1 M (292 µg) anhydrous EDTA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). The discs were placed 25 mm apart on a MH agar plate. An increase in the zone diameter of >4 mm around the imipenem-EDTA disc compared with that of the imipenem disc alone was considered positive for MBL production.

2.6. Phenotypic detection of AmpC and ESBL production in CRPA isolates

Extended spectrum β-lactamase (ESBL) production was detected by the double-disc synergy test (DDST) using clavulanic acid-ticarcillin (20/10 mg) and ceftazidim (30 mg) and aztreonam (30 mg) on MH agar as described previously [8,21]. Phenotypic detection of ESBLs can be obscured by chromosomal AmpC cephalosporinase in *P. aeruginosa*; hence DDST with cloxacillin was performed. Cloxacillin (250 µg/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) was added to MH agar to inhibit cephalosporinase activity [8,9]. AmpC overproduction was confirmed according to the method of Touati, Diene [8], Sefraoui, Berrazeg [9]. Isolates were considered positive for AmpC overproduction when there was at least a two-fold dilution difference between the MICs of ceftazidime and imipenem alone and the MICs of ceftazidime and imipenem with cloxacillin [8,9].

2.7. Preparation of DNA template for PCR

A few colonies of an overnight culture of *P. aeruginosa* isolates on Luria Bertani agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were suspended in 500 µL of DNase- and RNase-free water (Invitrogen, Paisley, UK). The suspension was boiled at 100 °C for 10 min in a thermal block (Polystat 5, Bioblock Scientific, France), then centrifuged at 19,000 × *g* for 5 min. A 1-µL aliquot of the supernatant was used as the DNA template for PCR.

2.8. Detection of β-lactamase-encoding genes

All CRPA isolates were screened by PCR for the following carbapenemase genes: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} and others β-lactamases: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SPE-1} and *bla*_{OXA-1}, as described previously [22–24]. CRPA resistance to ceftazidim was further tested using primers specific for plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes as described by Pérez-Pérez and Hanson [25].

2.9. Detection of class 1 integrons

PCR was performed using primers CS-3' and CS-5' to amplify different fragment sizes of class 1 integrons. The primers, PCR

conditions and reaction mixtures used were as described previously [22].

2.10. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes and aminoglycoside resistance determinant genes

The assessment of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and aminoglycoside resistance determinants in CRPA strains was conducted as described previously [24,26]. All CRPA strains were screened by multiplex PCR for *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrC* and *qnrS*). PCR amplification of *aac*(6)-Ib (encoding aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib), *aac*(3)-II (encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferase genes) and 16S RNA methylase genes (*armA*, *rmtA*, *rmtB* and *rmtC*) was performed using primers that amplified all variants.

2.11. Sequencing of resistance genes

All amplified products were sequenced to validate their identities. Both strands of the purified amplicons were sequenced with a Genetic Analyzer 3130 × 1 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the same primers used for PCR amplification. The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with software available on the National Center for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.12. Genotyping of MBL-producing *P. aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed according to the standardized protocol developed by Durmaz et al. [27] using *SpeI*. The Dice similarity coefficient was calculated between pairs of lanes, and then strains were grouped using the dendrogram construction tool Dendro UPGMA (Biochemistry and Biotechnology Department, Rovirai Virgili University, Tarragona, Spain) (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>). The isolates were considered to be genetically related if the Dice coefficient of correlation was 80% or greater.

2.13. Virulence phenotypes study

Proteolytic activity. Casein hydrolysis was tested on tryptone casein soy (TCS) agar plates (Sanofi Diagnostics Pasteur) containing 10% (w/v) skimmed milk (Difco, Barcelona, Spain) and streptomycin at 50 g/mL. After centrifugation at 13,000 × *g* for 10 min, 100 µL of each suspension was placed in 5-mm-diameter wells cut into TCS agar and incubated at 37 °C for 24 h. This test was performed in triplicate. The presence of a transparent zone around the wells indicated protease activity and the diameter of the transparent zone reflected the intensity of the exo-enzyme released [28].

Haemolytic activity. Haemolytic activity was measured to assess the presence of virulence factors associated with haemolysis. Briefly, strains were tested for haemolytic activity on agar base (Oxoid, France) supplemented with 5% sheep erythrocytes. 5 µL of each suspension was streaked onto the plates and incubated at 37 °C for 24 h. This test was carried out

in triplicate. The presence of a clear colourless zone surrounding the colonies indicated haemolytic activity [28,29].

DNase test agar. DNase test agar was used to identify bacteria capable of producing DNase, an exoenzyme. The test agar contained an emulsion of DNA and peptides as a nutrient source. Bacterial colonies that secrete DNase hydrolyze the DNA in the medium into smaller fragments; when plates are flooded with HCl, this results in clearing around the bacterial colony [30].

Motility study. This test was carried out in triplicate. The degree of motility of the tested isolates was variable; a cutoff of 1 cm of motility was chosen to distinguish between highly motile (>1 cm) and less motile (<1 cm) strains.

- “Swimming” test. Tryptone swim plates (1% tryptone, 0.5% NaCl and 0.3% agar) were inoculated with bacteria using a sterile toothpick and incubated for 16 h at 25 °C. Motility was assessed qualitatively by examining the circular turbid zone formed by bacterial cells migrating away from the point of inoculation [29].
- “Swarming” test. Swarm plates were composed of 0.5% Bacto Agar and 8 g of nutrient broth/litre (both from Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 5 g of dextrose/litre and dried overnight at room temperature (30 °C). Cells were point inoculated with a sterile toothpick, and the plates were incubated at 30 °C for 24 h. Motility was then assessed qualitatively by examining the circular turbid zone formed by bacterial cells migrating away from the point of inoculation [29].
- “Twitching” test. The *P. aeruginosa* colony tested was stab-inoculated (approximately 3-mm depth) into an agar plate. After incubation at 30 °C for, the agar was carefully removed and the zone of motility at the agar/plate interface was visualized and measured by staining with crystal violet [29].

2.14. Biofilm assay

A slightly modified version of the microtitre plate assay developed by O’Toole and Kolter [31] was used for the biofilm assay. Briefly, 4 µL of overnight culture was inoculated into 100 µL of LB in a 96-well culture-treated polystyrene microtitre plate (Nunc) with different concentrations of imipenem (4–128 µg/mL) and ciprofloxacin (0.5–8 µg/mL). Control plates did not contain antibiotics. We then studied the effect of imipenem and ciprofloxacin on the biofilm-forming ability of one isolate from each MBL-producer clone (Pa.4 for clone A, Pa.12 for clone B, Pa.10 for clone C and Pa.27 for clone D).

All assays were performed in triplicate. After regular time intervals of two hours of incubation at 37 °C, surface-adherent biofilm formation was measured by staining bound cells for 15 min with a 0.5% (w/v) crystal violet. After rinsing with distilled water, bound dye was released from stained cells using 95% ethanol. The number of bound cells was determined by measuring the optical density (OD) at 550 nm.

As a control, sterile medium was used to determine background OD. The cut-off OD (OD_c) was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. According to the results of the microtiter plate test, the isolates were classified into the four following categories based on the OD: non-biofilm producers (OD test < OD_c), weak

biofilm producers (OD_c < OD < 2× OD_c), moderate biofilm producers (2× OD_c < OD < 4× OD_c), and strong biofilm producers (4× OD_c < OD).

3. Data analysis

To identify variables associated with carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, a risk factor analysis was performed using a case-control study format. Demographics and hospitalization variables from patients infected with *P. aeruginosa* and CRPA patients were compared with non-infected patients and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* (CSPA) patients, respectively. Data were entered into a database using the SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). The χ^2 test and independent samples t tests were used for categorical and continuous variables, respectively. A stepwise multivariate logistic regression was conducted to examine the association of risk factors, while controlling for potential confounders. The logistic model included all variables for which $p < 0.1$ was obtained in the multivariate analysis. $p < 0.05$ was considered significant.

4. Results

A total of 50 patients were included in this study and the distribution was 48% female (F) and 52% male (M) (M:F ratio of 1.08). Thirty patients presented with *P. aeruginosa* infection (60%; 95% CI: 46.4–73.6) with 15(50%) patients with CRPA infection. The median age was 39.5 in the CRPA group and 44 in the CSPA group, with no significant difference, using parametric (for mean) or non-parametric (for median) tests. The duration of hospitalization was different between the groups (CSPA and CRPA), although it had a tendency to be prolonged in the CSPA group (Table 1). A comparison between infected and non-infected patients revealed that the duration of hospitalization was statistically different and 90–120 days for patients infected with *P. aeruginosa*.

In the group of patients infected with *P. aeruginosa*, most burns were due to flames by gas explosion (46.7%). Burns due to hot water and electricity were relatively common at 26.7 and 23.3%, respectively. The most common burn sites included the upper limbs, head/neck and chest. Among the CRPA isolates, 12 (70.6%) were isolated from hospitalized patients who underwent surgery such as skin grafting at the intensive care unit. Even though several variables were compared (CRPA vs. CSPA), urinary catheter use and intubation were statistically significant. In the multivariate analysis, none of the risk factors for CRPA were identified. However, the comparison between infected and non-infected patients revealed that previous use of macrolide antibiotics and polymicrobial infection were statistically significant. The mortality of patients with *P. aeruginosa* infection was 46.7% for patients with CRPA and 33.3% for patients with CSPA, without statistical significance.

Virulence studies on all *P. aeruginosa* strains were performed to verify the virulence factors profile. Virulence factors from all *P. aeruginosa* strains isolated including CRPA and CSPA isolates are shown in Table 2. Swimming and swarming motility types were exhibited by all tested strains

Table 1 – Characteristics of patients infected with carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*.

| Factors | Patients infected with <i>P. aeruginosa</i> , % (n) | | | | Non infected patients with <i>P. aeruginosa</i> , % (n) | p-value |
|------------------------------------|---|-----------|---------|--------------|---|---------|
| | CRPA | CSPA | p-value | All isolates | | |
| Gender | | | | | | |
| Male | 66.7 (10) | 46.7 (7) | NS | 53.3 (16) | 50 (10) | NS |
| Female | 33.3 (5) | 53.3 (8) | NS | 46.7 (14) | 50 (10) | NS |
| Age (years) | | | | | | |
| Mean | 44.6 | 35.1 | NS | 39.7 | 46.76 | NS |
| SD | 20.44 | 20.12 | NS | 20.51 | 20.57 | NS |
| Hospitalization stay (days) | | | | | | |
| [1–30] | 33.3 (5) | 13.3 (2) | NS | 23.3 (7) | 40 (8) | NS |
| [30–60] | 13.3 (2) | 33.3 (5) | NS | 23.3 (7) | 40 (8) | NS |
| [60–90] | 0 | 6.7 (1) | NS | 3.3 (1) | 15 (3) | NS |
| [90–120] | 20 (8) | 46.7 (7) | NS | 51.6 (16) | 5 (1) | 0.0006 |
| Burn cause | | | | | | |
| Electricity | 26.7 (4) | 20 (3) | NS | 23.3 (7) | 10 (2) | NS |
| Gas explosion | 46.7 (7) | 46.7 (7) | NS | 46.7 (14) | 55 (11) | NS |
| Hot water | 20 (3) | 33.3 (5) | NS | 26.7 (8) | 35 (7) | NS |
| Petrol | 6.7 (1) | 6.7 (1) | NS | 6.7 (2) | 0 | NS |
| Burn degree | | | | | | |
| First + second-degree (deep) | 6.7 (1) | 0 | NS | 3.3 (1) | 5 (1) | NS |
| Second-degree (deep) | 26.7 (4) | 40 (6) | NS | 33.3 (10) | 40 (8) | NS |
| Second + third-degree (deep) | 53.3 (8) | 60 (9) | NS | 56.7 (17) | 50 (10) | NS |
| Third-degree (deep) | 6.7 (1) | 0 | NS | 3.3 (1) | 5 (1) | NS |
| Second-degree (superficial) | 6.7 (1) | 0 | NS | 3.3 (1) | 5 (1) | NS |
| Previous antibiotics use | | | | | | |
| Aminoglycoside | 80 (12) | 46.7 (7) | NS | 63.3 (19) | 70 (14) | NS |
| Macrolide | 0 | 20 (3) | NS | 10 (3) | 40 (8) | 0.017 |
| Fluroquinolone | 66.7 (10) | 66.7 (10) | NS | 66.7 (20) | 45 (9) | NS |
| 3rd Generation Cephalosporin | 6.7 (1) | 33.3 (5) | NS | 20 (6) | 25 (5) | NS |
| Carbapenem | 33.3 (5) | 20 (3) | NS | 26.7 (8) | 5 (1) | NS |
| Invasive devices | | | | | | |
| Intubation | 26.7 (4) | 26.7 (4) | NS | 26.7 (8) | 5 (1) | NS |
| Intubation + Urinary catheter | 60 (9) | 13.3 (2) | 0.008 | 36.7 (8) | 15 (3) | NS |
| Surgical intervention | | | | | | |
| Yes | 60 (9) | 68.7 (11) | NS | 66.7 (20) | 40 (8) | NS |
| No | 40 (6) | 26.6 (4) | NS | 33.3 (10) | 65 (12) | NS |
| Polymicrobial infection | | | | | | |
| Yes | 93.3 (14) | 80 (12) | NS | 86.7 (26) | 5 | <0.0001 |
| No | 6.7 (1) | 20 (3) | NS | 13.3 (4) | 95 | NS |
| Mortality | | | | | | |
| Yes | 46.7 (7) | 33.3 (5) | NS | 40 (12) | NA | NA |
| No | 53.3 (8) | 66.7 (10) | NS | 63.3 (19) | NA | NA |

NS, non-significant, CRPA, carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA, carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*.

and the twitching motility type was exhibited by 80.6% (86.6% CRPA vs. 75% CSPA) of strains tested. CSPA isolates expressed haemolytic (75% CSPA vs. 66.6% CRPA) and DNase activity (81.2% CSPA vs. 73.3% CRPA) more frequently. In contrast, CRPA isolates had greater protease production (86.6% CRPA vs. 81.2% CSPA). Only 62% of all strains were able to produce all three virulence factors.

All *P. aeruginosa* isolates were able to adhere to the surface of polystyrene and form a biofilm. A comparison between CRPA and CSPA isolates revealed that kinetics of biofilm-forming ability was very heterogeneous (Fig. 1). CSPA isolates were stronger biofilm formers than CRPA isolates. CRPA isolates were more moderate and weak biofilm formers than

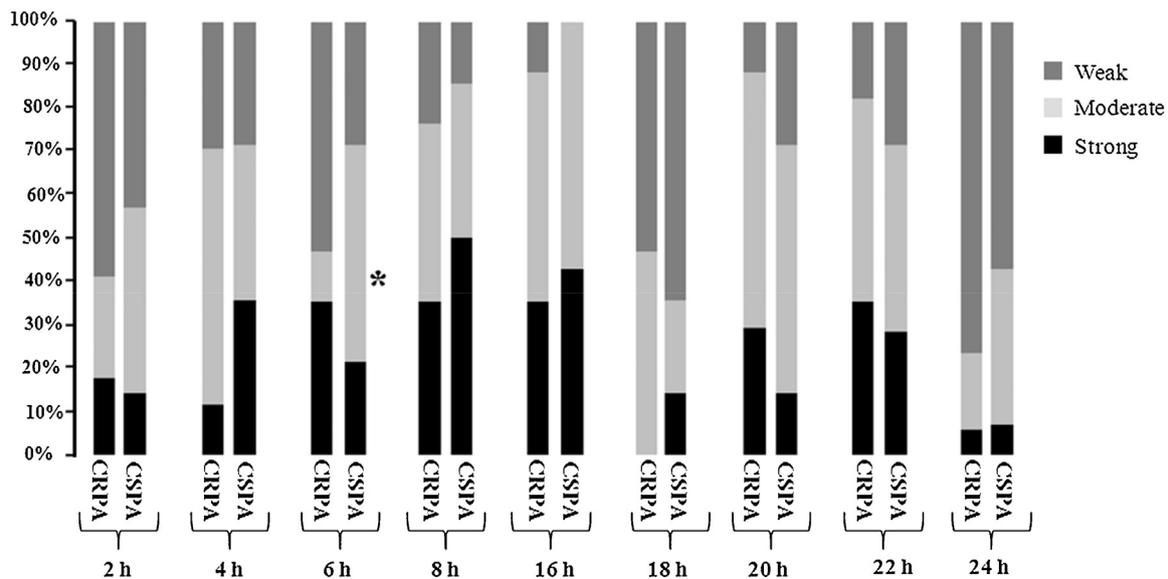
CSPA isolates in almost all incubation times except the 6-h incubation time where 50% of CSPA isolates were significantly more frequent ($p = 0.04$) moderate biofilm formers than CRPA isolates (Fig. 1).

Antimicrobial susceptibility testing was assessed using the disc diffusion method on 30 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Of all the isolates tested, resistance for β -lactam antibiotics was 100% (ticarcillin), 96.7% (piperacillin), 96.7% (ceftazidime), 96.7% (cefepime), 93.5% (ceftriaxone), 70.9% (ticarcillin/clavulanic acid) and 32.2% (aztreonam). For non- β -lactam antibiotics, the resistance was 80.6% (gentamicin), 48.4% (amikcin), 22.5% (ciprofloxacin), 22.5% (levofloxacin) and 29% (colistin). Overall, a significantly greater number of CRPA

Table 2 – The distribution of virulence factors of carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* isolates.

| Virulence factor | CRPA isolates % (n) | | | CSPA isolates % (n = 16) | All strains (n = 31) |
|-------------------|---------------------|----------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| | CP (n = 7) | Non-CP (n = 8) | All strains (n = 15) | | |
| Haemolytic | 71.43 (5) | 62.5 (5) | 66.6 (10) | 75 (12) | 70.9 (22) |
| Proteolysis | 85.71 (6) | 87.5 (7) | 86.6 (13) | 81.2 (13) | 83.7 (26) |
| DNase | 85.71 (6) | 62.5 (5) | 73.3 (11) | 81.2 (13) | 77.4 (24) |
| Twitching | 100 (7) | 62.5 (5) | 86.6 (13) | 75 (12) | 80.6 (25) |
| Swimming | 100 (7) | 100 (8) | 100 (15) | 100 (16) | 100 (31) |
| Swarming | 100 (7) | 100 (8) | 100 (15) | 100 (16) | 100 (31) |
| Biofilm formation | 100 (7) | 100 (8) | 100 (15) | 100 (16) | 100 (31) |

CP, carbapenemase producers; Non-CP, non-carbapenemase producers; CRPA, carbapenem-resistant *P. aeruginosa*; CSPA, carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*.

**Fig. 1 – Comparison of the biofilm-forming ability between carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa* isolates. * $p < 0.05$. CRPA: carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA: carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*.**

isolates were resistant to ticarcillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin and colistin than CSPA isolates (Table 3).

For all CRPA isolates, the MIC of imipenem was $>32 \mu\text{g/mL}$. Among the 15 CRPA isolates, seven (46.6%) isolates tested positive for MBL and carbapenemase using the MBL screen with EDTA and a modified Hodge test, respectively. PCR and sequencing analysis on CRPA isolates revealed a *bla*_{VIM-4} gene in six strains and a *bla*_{VIM-2} gene in one strain of an MBL-positive isolate. The characteristics of VIM-positive isolates and patients infected by these strains are presented in Fig. 2. None of the isolates that tested negative for MBL and carbapenemase gave positive PCR results for the carbapenemase-encoding genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51}. Synergy tests using clavulanic acid with ticarcillin-, aztreonam-, and ceftazidime-containing disks did not give evidence of inhibition of aztreonam and ceftazidime resistance for all CRPA and CSPA isolates, indicating ESBL was not produced. AmpC over-expression has been previously reported to correlate highly with ceftazidime resistance. We found that AmpC over-expression was present in 70.96% of

CRPA isolates. These results were confirmed by the detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes by PCR. The 16S rRNA methylase, *rtmB* was detected in one isolate, Pa.27. The class 1 integron (*Int1*) was detected in all MBL-producing isolates, except the Pa.27 isolate, as a 1-kb PCR amplicon. Sequence analysis of these amplicons revealed the presence of the *aadA7* gene cassette.

In the genotyping analysis, the DNA fingerprint patterns of the seven MBL-producing isolates revealed four distinct clones, clones A, B, C and D (Fig. 2). Three of these clones (clones A, C and D) were represented by a single isolate. Clone B was represented by four isolates (Pa.8, Pa.9, Pa.11 and Pa.12). Clone A was identified in strain Pa.4, which was isolated in August 2014 from a 42-year-old male. This patient was hospitalized in the intensive care unit with 21% degree of his body burned at the head and chest. Two isolates (Pa.8 and Pa.9) with clone B were isolated on the same day in September 2014 from two patients- a 19-year-old male with 60% degree of burns and a 21-year-old female who was hospitalized for skin graft abscesses. The two other strains (Pa.11 and Pa.12) obtained in October 2014 were isolated from a male and

Table 3 – Comparison of antimicrobial susceptibility between carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*.

| Antibiotics | Resistance ratios, % (no. resistant strains) | | | | |
|-------------|--|-----------------|----------------------|---------------|----------------------|
| | CRPA | | | CSPA (n = 16) | All strains (n = 31) |
| | CP (n = 7) | Non-CP (n = 10) | All strains (n = 15) | | |
| TIC | 100 (7) | 100 (10) | 100 (17) | 100 (14) | 100 (31) |
| TCC | 100 (7)* | 90 (9)* | 94.12 (16)** | 42.86 (6) | 70.97 (22) |
| PIP | 100 (7) | 90 (9) | 94.12 (16) | 100 (14) | 96.77 (30) |
| CAZ | 100 (7) | 90 (9) | 94.12 (16) | 92.86 (13) | 93.55 (29) |
| ATM | 100 (7)*** | 80 (8)*** | 47.06 (8) | 14.29 (2) | 32.26 (10) |
| FEP | 100 (7) | 90 (9) | 94.12 (16) | 100 (14) | 96.77 (30) |
| CRO | 100 (7) | 90 (9) | 94.12 (16) | 100 (14) | 96.77 (30) |
| LEV | 0 | 60 (6)** | 35.29 (6) | 7.14 (1) | 22.58 (7) |
| CIP | 0 | 60 (6)** | 35.29 (6)*** | 7.14 (1) | 22.58 (7) |
| AK | 85.71 (6) | 90 (9) | 88.24 (15)*** | 0 | 48.39 (15) |
| GN | 100 (7)*** | 100 (10)*** | 100.00 (17)** | 57.14 (8) | 80.65 (25) |
| Cs | 14.29 (1) | 70 (7)** | 47.06 (8) | 7.14 (1) | 29.03 (9) |

* $p < 0.01$.** $p < 0.001$.*** $p < 0.0001$.

CP, carbapenemase producers, Non-CP, non-carbapenemase producers, CRPA, carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA, carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*, TIC, ticarcillin, CRO, ceftriaxon, PIP, piperacillin, FEP, cefepime, TCC, ticarcillin/clavulanic acid, CAZ, ceftazidim, ATM, aztreonam, AK, amikacin, GN, gentamicin, CIP, ciprofloxacin, LEV, levofloxacin; Cs, colistin.

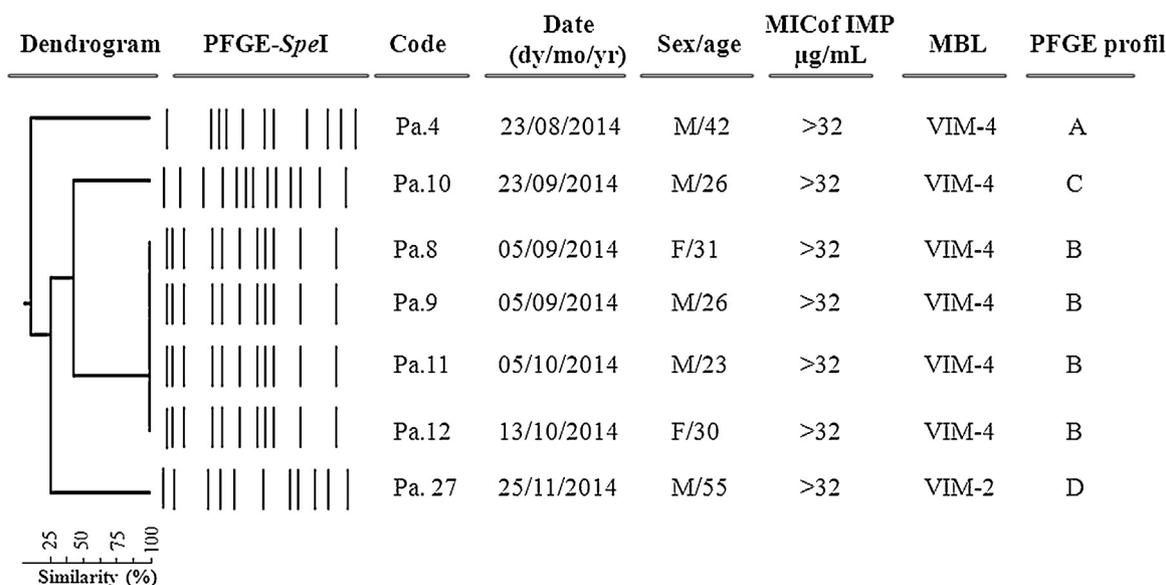


Fig. 2 – Representative *SpeI* pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of MBL-producing *P. aeruginosa* isolates. The dendrogram was generated with Dendro UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>). The PFGE profile, sex and age of patients infected, and MBL enzyme are indicated.

female with 60% and 98% degree of burns, respectively. The Pa.27 isolate included in clone D was isolated in November 2014 from a patient with 78% degree of burn.

The adherence and biofilm-forming ability of *P. aeruginosa* on different surfaces at hospitals are believed to be the primary source of infection and diffusion of epidemic strains. A strain's ability to form a biofilm on surfaces and the detachment of cell clumps from biofilm aggregates was probably responsible for cross-contamination during the study period. Since most patients were receiving antibiotics,

we assessed the behaviour of biofilm from MBL-producing *P. aeruginosa* isolates in the presence of antibiotics.

We then studied the effect of imipenem and ciprofloxacin on the biofilm-forming ability of one isolate from each MBL-producer clone (Pa.4 for clone A, Pa.12 for clone B, Pa.10 for clone C and Pa.27 for clone D). In the presence of sub-MICs of ciprofloxacin, the biofilm biomass, as measured by the OD, decreased and there was an inverse relationship between OD and antibiotic concentration (Fig. 3). However, when the concentration of imipenem increased, the biofilm biomass

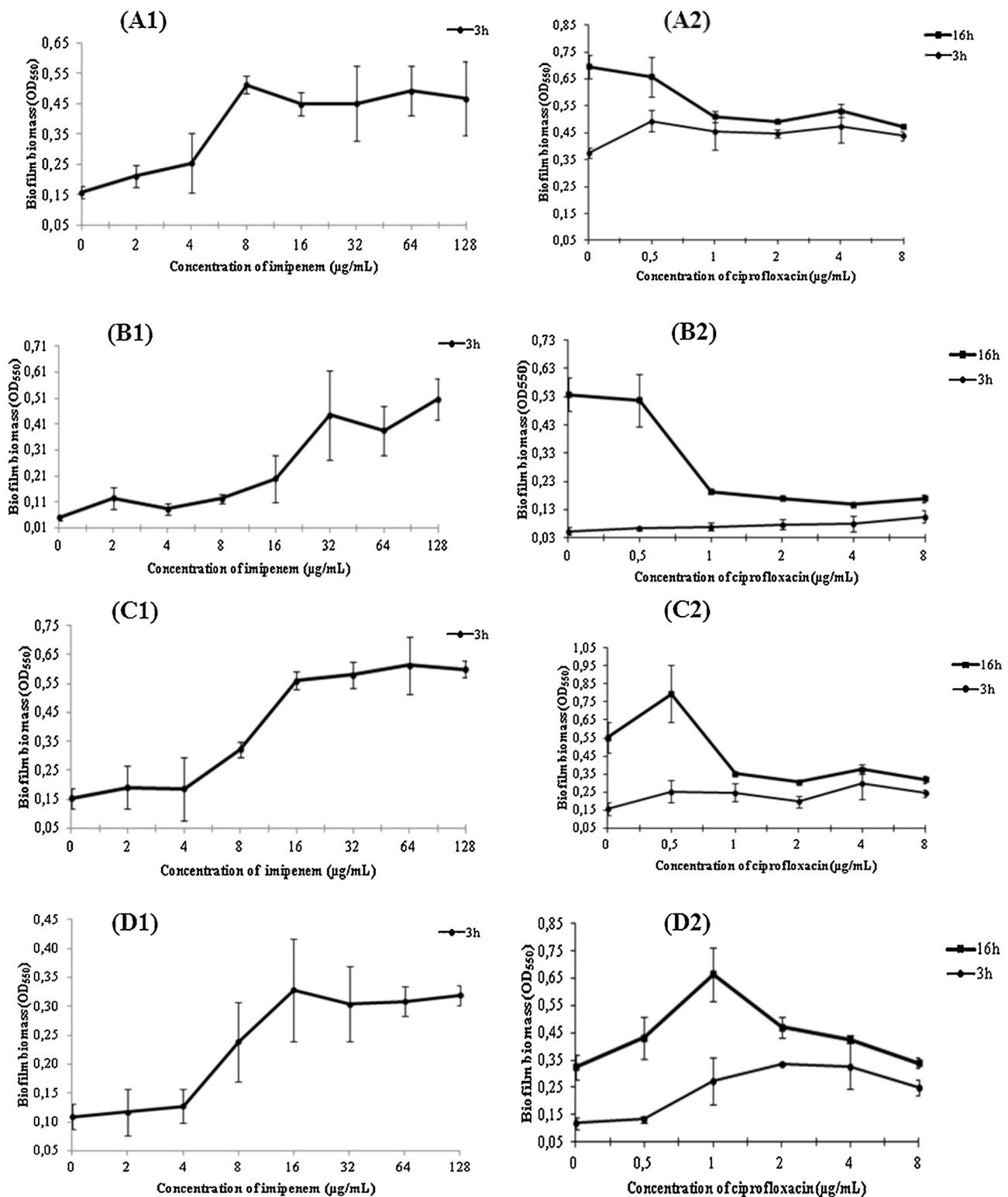


Fig. 3 – Quantification of the biofilm biomass by crystal violet staining (OD₅₅₀) in the presence of increasing concentrations of imipenem and ciprofloxacin in microtitre plates after 3 h of incubation for imipenem and 3 or 16 h for ciprofloxacin. (A1), (A2): Pa.4 isolate; (B1), (B2): Pa.12 isolate; (C1), (C2): Pa.10 isolate and (D1), (D2): Pa. 27 isolate.

also increased (Fig. 3). Since for imipenem, all concentrations tested were at least 4-fold lower than the MIC, we can infer that sub-inhibitory concentrations of this antibiotic enhance biofilm formation.

The effects of different concentrations of imipenem and ciprofloxacin on the kinetics of *P. aeruginosa* biofilm production are presented in Fig. 4. With imipenem and ciprofloxacin, the biofilm biomass increased when the concentration of

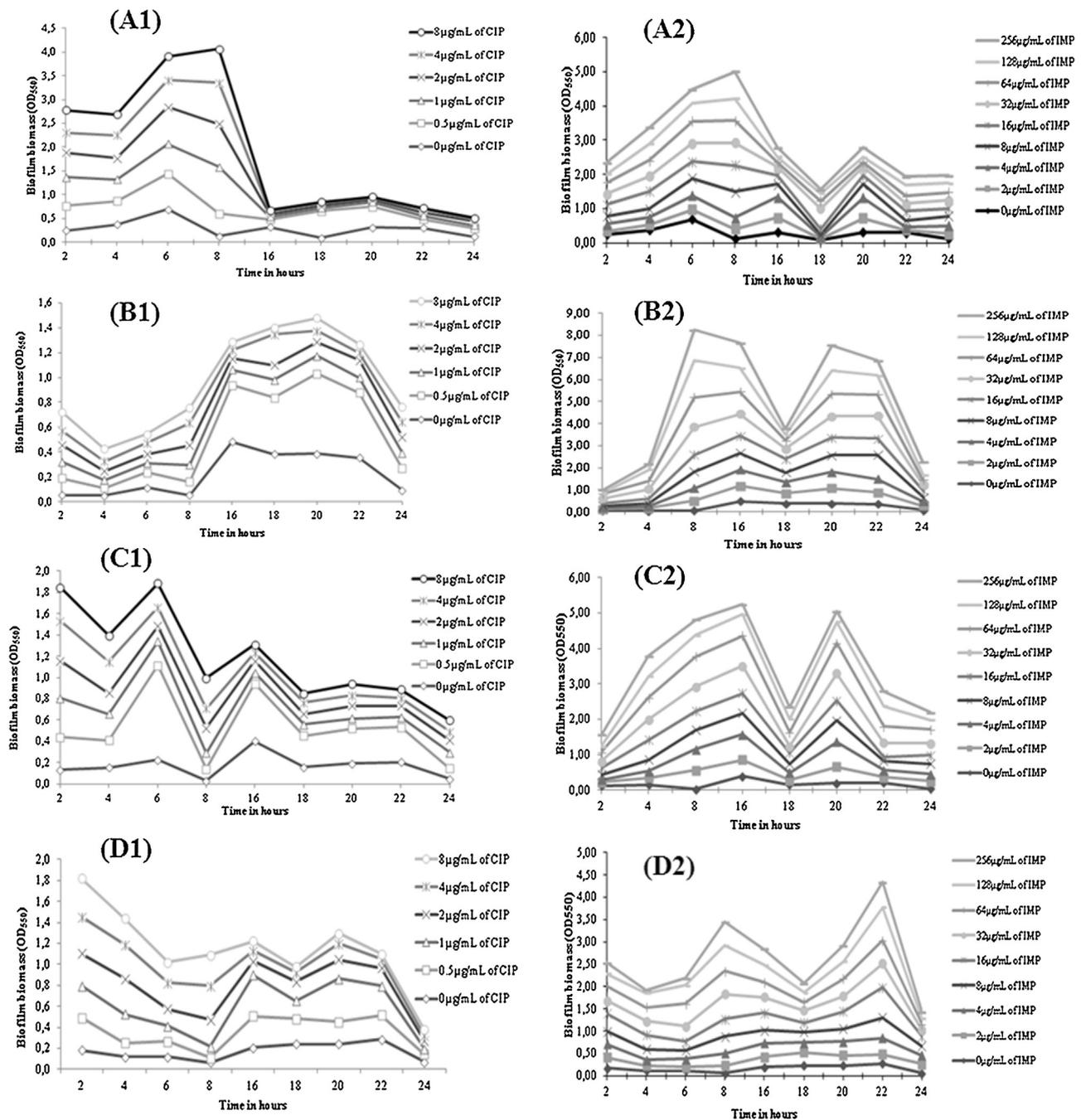


Fig. 4 – Adhesion kinetics of *P. aeruginosa* strains cultivated in the presence and absence of different concentrations of imipenem and ciprofloxacin in microtitre plates. (A1), (A2): Pa.4 isolate; (B1), (B2): Pa.12 isolate; (C1), (C2): Pa.10 isolate and (D1), (D2): Pa.27 isolate.

imipenem and ciprofloxacin and the incubation time increased, this was linked by the time required for maximal adhesion, which ranged from 8 to 22 h.

5. Discussion

It has been given that Burn wards harbour MDR isolates of *P. aeruginosa* which can colonize burn patients and lead to infection [32,33]. Our study showed a high prevalence of *P.*

aeruginosa infections (62%) among burn patients compared with studies from other countries, such as Morocco (15.1%) [34], Tunisia (15%) [35], Egypt (19.8%) [36], Iran (37.5%) [37] and India (59%) [38]. This difference might be attributed to antibiotics abuse, different hospital strategies for the management of infections, hygiene and geographic climatic. In the present study, the administration of macrolide antibiotics, longer hospitalization and the presence of polymicrobial infections, especially infection with *Staphylococcus* species, were the greatest risk factors for *P. aeruginosa* infections in the burn unit.

Treatment of *P. aeruginosa* infection is frequently complicated by limited susceptibility to antimicrobial drugs and the spread of antibiotic resistance during therapy. Carbapenems have been the drug of choice for the treatment of infections caused by MDR *P. aeruginosa* strains [39]. In latest years, Algeria has been configured as one of countries with the highest rates of antimicrobial resistance [8,23,40]. In our study, there were high rates of resistance to all commercially available antimicrobial drugs among *P. aeruginosa* isolated from Annaba Hospital. 48.38% of CRPA isolates were carbapenem resistant; this limits the treatment options in hospitals. The percentage of CRPA isolates varied by geographic region, specimen source, and the presence of selective pressure from antibiotics [41]. In Algeria, Drissi et al. [40] concluded that *P. aeruginosa* isolates had the highest resistance to imipenem (35%) in a study conducted during the period 2005–2007. Also, Sefraoui et al. [23] showed that among *P. aeruginosa* strains, 39.32% were resistant to imipenem in a study conducted during the period 2009–2012. However, the CRPA frequency shown in the studied hospitals during the period 2014–2015 was higher than those reported in Algeria. Among neighbouring countries, such as Libya, Tunisia and Egypt, the incidence of imipenem resistant *P. aeruginosa* ranged from 24.2 to 39.34% [42–44].

Resistance to carbapenem in *P. aeruginosa* is due to multiple mechanisms with or without the production of carbapenemase [39]. Diminished expression or mutational loss of the specific porin OprD and carbapenem hydrolyzing enzymes-carbapenemase are the most common mechanism of resistance to carbapenems [39,45]. In the present study, 46.6% of CRPA isolates were MBL producers with *bla*_{VIM-4} and *bla*_{VIM-2} type detected. A few MBL-producing *P. aeruginosa* isolates have been documented in Africa, particularly in North Africa. In Algeria, VIM-19 was the first carbapenemase identified, especially in *Enterobacteriaceae* species [46]. Recently, Touati et al. [8] was the first to identify *bla*_{VIM-2} in clinical isolates of

P. aeruginosa from eastern Algeria. A second description of VIM-2-producing *P. aeruginosa* throughout the year was reported in western Algeria [9]. Our study was the first to report the detection of VIM-4-producing *P. aeruginosa* in North Africa. This discovering may indicate the current emergence of MBLs in clinically relevant Gram-negative strains throughout Northern Africa.

Worldwide reports of VIM-4 class MBL isolates in *P. aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* are illustrated in Fig. 5. As *bla*_{VIM} genes are carried on gene cassettes in class 1 integrons, they can be disseminated rapidly. Bacteria producing VIM-4 have been disseminated worldwide, in different geographical (Greece, Italy, Sweden, Hungary, Poland, Belgium, Tunisia, USA and Australia) and were associated to different species (*P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas* spp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* [47].

Previous studies have investigated the incidence of aminoglycoside resistance mechanisms from different countries [39,48,49]. In the current study, our finding indicates that a higher rate of gentamicin resistance was found in CRPA (100%). This was much higher than the levels previously reported in Annaba hospitals (28.09%) [23]. The class I integron with *aadA7* gene cassette were found in six CRPA isolates. These class I integrons may appear as an important tool in the emergence of antimicrobial resistance and spread of MDR *P. aeruginosa* [50]. The *aadA7* family of enzymes in these strains provide resistance to tobramycin and amikacin (subfamily I) or gentamicin (subfamily II). *P. aeruginosa* aminoglycoside resistance was primarily mediated by transferable aminoglycoside-modifying enzymes, followed by 16 rRNA methylase [39,51,52]. In the current study, *rmtB* gene was identified in one MBL-producing isolate. To the best of our knowledge, this finding is the first description of the *rmtB* gene in Algeria and North Africa, especially in MBL-producing *P. aeruginosa*. *rmtB* gene is associated with mobile genetic elements, such as

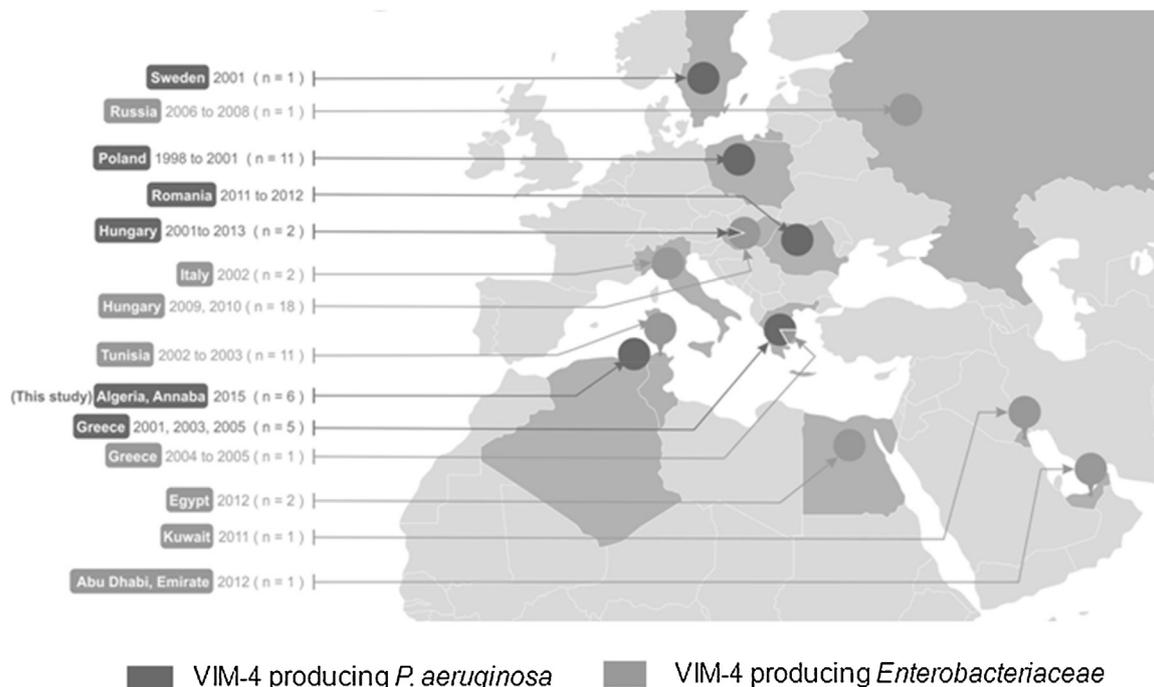


Fig. 5 – Geographical distribution of VIM-4 producing *P. aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* isolates worldwide.

transposons [39,51,52], that provide the means to spread horizontally to other strains and species.

In this study, we used PFGE to examine the clonality of MBL-producing *P. aeruginosa* isolated from the burn unit. Among seven MBL producers, clonal diffusion was observed in four strains. This clonal diffusion of MDR strains suggests that hospitals need to develop better strategies to prevent and control infections. This involves screening and identification of colonized or infected patients, treatment of infected patients, and implementation of preventative geographic isolation. The risk factors for acquiring CRPA were supported by results of previous studies demonstrating that the host condition, infection control practices, and antimicrobial use can be related [53–55]. Regarding invasive procedures, in our study, urinary catheter use and intubation were the only risk factors related with CRPA infection. This is due to the fact that *P. aeruginosa* tends to form a biofilm on the surface of urinary catheters, which increases the possibility of dissemination of bacteria to the other body locations, causing infection [56,57]. In our study, 100% of the clinical isolates of *P. aeruginosa* were able to form biofilm on polystyrene substrate and the best biofilm producers were CRPA strains, suggesting biofilm formation is a mechanism that promotes resistance chemotherapeutic agents [58]. This was not surprising, given that *P. aeruginosa* tends to make biofilm on the surface of urinary catheters increased the possibility of dissemination of bacteria to the urinary tract, causing infection. In addition, several studies found that 80–100% of *P. aeruginosa* strains isolated from different anatomical sites and catheters were able to form biofilm on polystyrene microtiter plates. Furthermore, these studies found that MDR-producing *P. aeruginosa* isolates were associated with an increased ability to form biofilm, but reduced motility, pigment production and in vitro fitness [59–63].

In this study, we examined the effect of sub-MIC concentrations of imipenem and ciprofloxacin on the kinetics of biofilm formation of MBL-producing *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* isolates cultivated with these antibiotics in microtiter plates had significantly greater biofilm production compared with the same isolates cultivated in the absence of these antibiotics. These results are in accordance with the previous observations by Linares et al. [64] who found that sub-MIC concentrations of tobramycin, ciprofloxacin and tetracycline induced *P. aeruginosa* biofilm formation by approximately 2-fold as determined by crystal violet staining. The induction of *P. aeruginosa* biofilm formation by imipenem and ciprofloxacin was previously observed to be associated with an increase in alginate production. The mechanism of biofilm induction involves co-regulatory networks that confer β -lactam resistance, the alginate production pathway (*algD*, *algA*), quorum-sensing and virulence factor production, with AmpR and AmpC playing a central role [65]. In addition to biofilm formation, at least 60% of clinical strains of *P. aeruginosa* had DNase, haemolytic and proteolytic activity. These enzymatic activities are important virulence factors during *P. aeruginosa*–host interplay, and contribute to the establishment of the infectious process [66]. Bacterial motility is one of virulence factor that organisms use to initiate colonization and trigger their pathogenic [66]. Our study showed that at least 86.6% of CRPA isolates exhibited

twitching, swimming and swarming motility. Consequently, the treatment of burn patients infected by these MDR isolates is a difficult task and a real problem that needs to be solved.

6. Conclusion

Many MBLs have been described in bacteria from many genera and species worldwide. Algeria, like many countries, is now facing the threat of the emergence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. To the best of our knowledge, this is the first study to report a VIM-4-producing strain of *P. aeruginosa* in Algeria and the production of a VIM-4 MBL type enzyme in *P. aeruginosa* in North Africa. The detection of endemic clonal dissemination of MBL producing isolates in the burn unit and the presence of highly virulent MDR *P. aeruginosa* isolates suggests that the risk for serious infection is high in burn unit patients. Therefore strict measures should be developed to control the spread of these pathogens in the hospital setting.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. *Acta Med Iran* 2011;49:675–9.
- [2] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:582–610.
- [3] Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl. 4):17–32.
- [4] Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, et al. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:410–6.
- [5] Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist* 2005;11:254–9.
- [6] Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:221–2.
- [7] Rumbaugh KP, Hamood AN, Griswold JA. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for possible variations within the virulence genes exotoxin A and exoenzyme S. *J Surg Res* 1999;82:95–105.
- [8] Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2426–7.

- [9] Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain J. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist* 2014;20:156–61.
- [10] Pitout JD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P, et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:755–9.
- [11] Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1175–87.
- [12] McCarthy M. *Pseudomonas* genome reveals a formidable foe. *Lancet* 2000;356:918.
- [13] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959–64.
- [14] de Bentzmann S, Plésiat P. *Pseudomonas aeruginosa*: une virulence complexe. *Rev Francoph Lab* 2011;2011:73–81.
- [15] Cho HH, Kwon KC, Kim S, Koo SH. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Lab Med* 2014;34:286–92.
- [16] Jung GB, Nam SW, Choi S, Lee GJ, Park HK. Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biomed Opt Express* 2014;5:3238–51.
- [17] Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407:762–4.
- [18] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–8.
- [19] Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections 1988. *Z Arztl Fortbild* 1991;85:818–27.
- [20] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, vol. 32. Clinical and Laboratory Standards; 2012. p. 188.
- [21] Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D ss-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters* 2014;27:8–13.
- [22] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
- [23] Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist* 2014;20:156–61.
- [24] Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *J Antibiot* 2013;66:11–6.
- [25] Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153–62.
- [26] Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in the Moroccan community. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:290–1.
- [27] Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:372–7.
- [28] Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, et al. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2003;84:41–9.
- [29] Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 2001;183:1195–204.
- [30] Finnan S, Morrissey JP, O’Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 2004;42:5783–92.
- [31] O’Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;28:449–61.
- [32] Chaïbdrâa A, Medjellekh MS, Saouli A, Bentakouk MC. Le *Pseudomonas* Experience du Centre des Brûlés D’Annaba et Revue de la Littérature. *Ann Burns Fire Disasters* 2008;21:210–8.
- [33] Ozumba UC, Jiburum BC. Bacteriology of burn wounds in Enugu, Nigeria. *Burns* 2000;26:178–80.
- [34] Essayagh M, Essayagh T, Essayagh S, El Hamzaoui S. Épidémiologie de l’infection des plaies des brûlés de Rabat, Maroc: expérience de trois ans. *Méd Santé Tropic* 2014;24:8.
- [35] Zoghalmi A, Kanzari L, Boukadida J, Messadi AA, Ghanem A. Epidemiological profile and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn and traumatology center in Tunisia over a three-year period. *Tunis Med* 2012;90:803–6.
- [36] Mahmoud AB, Zahran WA, Hindawi GR, Labib AZ, Galal R. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in Egypt, with special reference to typing methods. *J Virol Microbiol* 2013;2013:10–3.
- [37] Ekrami A, Kalantar E. Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. *Indian J Med Res* 2007;126:541.
- [38] Agnihotri N, Gupta V, Joshi R. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. *Burns* 2004;30:241–3.
- [39] Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the Max. *Front Microbiol* 2011;2:65.
- [40] Drissi M, Ahmed ZB, Dehecq B, Bakour R, Plesiat P, Hocquet D. Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Med Mal Infect* 2008;38:187–91.
- [41] Morrow BJ, Pillar CM, Deane J, Sahn DF, Lynch AS, Flamm RK, et al. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:412–6.
- [42] Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghozzi R, Saidani M, Amine S, Ben Redjeb S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol* 2011;6:1746–2596.
- [43] Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;101635:23.
- [44] Rishi MB, Jrad SJ, Al-Gumati MA, Aboshkiwa MA. Nosocomial infections in a Surgical Department, Tripoli Central Hospital, Tripoli, Libya. *Ibnosina J Med Biomed Sci* 2013;5.

- [45] Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4783–8.
- [46] Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:466–70.
- [47] Lassaux P, Traoré DAK, Loisel E, Favier A, Docquier J-D, Sohier JS, et al. Biochemical and structural characterization of the subclass B1 metallo-β-lactamase VIM-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1248–55.
- [48] Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1349–53.
- [49] Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 2005;11:951–3.
- [50] Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013;12:29.
- [51] Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:479–87.
- [52] Dubois V, Arpin C, Dupart V, Scavelli A, Coulange L, André C, et al. β-Lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J Antimicrob Chemther* 2008;62:316–23.
- [53] Joo EJ, Kang CI, Ha YE, Kang SJ, Park SY, Chung DR, et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. *Microb Drug Resist* 2011;17:305–12.
- [54] Lin KY, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *J Microbiol Immunol Infect* 2014;21. 00008-5.
- [55] Rao GG. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs* 1998;55:323–30.
- [56] Morrow B, Pillar C, Deane J, Sahm D, Lynch A, Flamm R. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:412–6.
- [57] Meradji S, Barguigua A, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H, Elmdaghri N, et al. Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria. *Antimicrob Resist Infect Control* 2015;4:27.
- [58] Sommerfeld Ross S, Fiegel J. Nutrient dispersion enhances conventional antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:177–81.
- [59] Olejnickova K, Hola V. The comparison of selected virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* catheter isolates. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2012;61:21–8.
- [60] Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1770–5.
- [61] Wolska K, Kot B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2013;60:313–28.
- [62] Delissalde F, Amabile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:405–8.
- [63] Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5527–35.
- [64] Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martínez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:19484–9.
- [65] Balasubramanian D, Kong KF, Jayawardena SR, Leal SM, Sautter RT, Mathee K. Co-regulation of {beta}-lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2011;60:147–56.
- [66] Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 2014;30:1159–68.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

**Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in
Eastern Algeria**

Samah Meradji, Abouddihaj Barguigua, Khalid Zerouali, Dekhil Mazouz, Houria Chettibi,
Naima Elmdaghri and Mohammed Timinouni.

Published in Volume: 27, Issue 4, Pages

Online Ahead of Print: June 12, 2015

Name of the Journal: Antimicrobial Resistance and Infection Control

Latest Impact Factor* is: 2.716*2016

Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2016

RESEARCH

Open Access



Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria

Samah Meradji¹, Abouddihaj Barguigua^{2,3}, Khalid Zerouali³, Dekhil Mazouz⁴, Houria Chettibi¹, Naima Elmdaghri² and Mohammed Timinouni^{2*}

Abstract

Background: Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* has become a serious life-threatening problem due to the limited therapeutic options. In this study, we investigated the prevalence and the molecular epidemiology of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) isolated from three hospitals in Annaba city, Algeria.

Methods: During the study period (January, 2012 to December, 2013), all patients infected by *P. aeruginosa* were considered as the potential study population. Antibiotic susceptibility testing was performed as recommended by the CLSI. Screening of carbapenemase producer isolates was performed by using imipenem-EDTA double-disk synergy test and modified Hodge test. CRPA isolates were tested for the presence of genes encoding β -lactamases, plasmid mediated quinolone resistance, aminoglycoside resistance and class 1 integrons were investigated by PCR and sequencing. The clonal relatedness among CRPA isolates was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis method. The clinical data were collected to identify risk factors for CRPA carriage of *P. aeruginosa* infection.

Results: The overall prevalence of CRPA was 18.75 %. The risk factors for carrying CRPA were the length of hospital stay ($p = 0.04$), co-infections with *Staphylococcus aureus* ($p = 0.01$), and the use of urinary catheter ($p = 0.03$). The in-hospital mortality rate among case patients was 13.33 % compared with 1.53 % for control patients ($p = 0.09$). All CRPA isolates were multidrug resistance and the most effective antibiotic against CRPA isolates was amikacin and colistin. PFGE revealed an epidemic clonal dissemination of CRPA isolates. None of CRPA isolated were found to be carbapenemase-producers. The *bla*_{PSE-1} and *aac(3)-II* gene was detected in two and five strains respectively. The class 1 integrons were detected in 2 isolates with the presence of *aadA7* gene cassette in these integrons.

Conclusion: The endemic clonal dissemination and multi-drug resistance of CRPA isolates in our institution is highly alarming. Strict measure will be required to control the further spread of these pathogens in hospital setting.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Prevalence, Risk factors, Carbapenem resistance

Background

Pseudomonas aeruginosa is one of the major opportunistic and nosocomial pathogen that causes many severe and often fatal infections, especially in immunocompromised patients or those with underlying diseases [1]. Multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates have been detected in hospitals worldwide and associated with increased mortality and

costs due to prolonged hospitalization, need of surgery, and prolonged treatment with antibiotics [2]. Increasing resistance in *P. aeruginosa* isolates complicates the selection of adequate empirical therapy in severe infections. Carbapenems are potent broad spectrum β -lactam antibiotics, and one of the few remaining agents that have reliable activity against *P. aeruginosa* [1–3]. However, increased prevalence of resistance to carbapenems among these organisms has been noted [2]. Resistance against carbapenems by *P. aeruginosa* may occur through different mechanisms including: loss of the outer membrane porin OprD

* Correspondence: mohammed.timinouni@pasteur.ma

²Molecular Bacteriology Laboratory, Pasteur Institute of Morocco, 1, Place Louis Pasteur, 20360, Casablanca, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article

protein, reduced levels of drug accumulation due to efflux-pumps over-expression, and increased production of AmpC β -lactamases [1]. Also, *P. aeruginosa* may obtain genes encoding carbapenemase enzymes such as metallo- β -lactamases (MBLs) or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) [1, 4]. The MBL enzymes (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM, and NDM) are able to hydrolyze carbapenems efficiently and thus they are considered as the most clinically significant mechanism of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* isolates [4]. VIM-type MBLs are predominant in the Mediterranean region [5, 6]. At Annaba hospital in Algeria and since December 2010, VIM-2 producing *P. aeruginosa* has been isolated, mainly in surgery and intensive care unit [7, 8]. In 2012, an increasing rate of imipenem resistance in *P. aeruginosa* was observed in Annaba hospitals. The effect of carbapenem resistance on the outcome of *P. aeruginosa* infections and risk factors for acquiring carbapenem resistant *P. aeruginosa* (CRPA) in Algeria are unclear. Consequently, the primary objective of the study was to determine the prevalence and molecular characterization of CRPA isolated from our institution. A secondary objective of the study was to identify risk factors associated with carbapenem resistance. It is anticipated that an improved understanding of the prevalence, mechanism, and risk factors of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* may guide formulary decisions and the choice of empiric therapy for nosocomial infections in hospitals.

Methods and materials

Setting

The study was performed at Annaba university hospital in Annaba city, Algeria. It is one of the major teaching hospitals in the eastern part of Algeria and comprised three affiliated hospitals: Ibn Sina, Dorban and Ibn Rochd. These three facilities included a 279-bed community hospital, a 466-bed hospital dedicated especially to surgical specialties, and the last one with 198-beds, which serve a diverse spectrum of patients.

Data collection

All the patients infected by *P. aeruginosa* from January, 2012 to December, 2013 were included. The medical records of these patients were retrieved and reviewed. Information was obtained about basic demographic characteristics (age, sex, pre-infection hospital stay, and nosocomial origin) as well as co-morbid diseases (surgical intervention, renal diseases, respiratory diseases, central nervous diseases, and others), presence of previous antibiotic use, use of urinary catheters, intensive care unit admission, previous hospitalization, recent surgery, and length of hospital stay. The diagnosis of nosocomial

infection was established according to the Center for Disease Control (CDC) criteria.

Previous hospitalization was defined as hospitalization at Annaba University or another hospital within 30 days prior to the current admission. Recent surgery was defined as any surgical procedure performed in the operating room within 30 days of entry in the study. The origin of the isolate was accepted as nosocomial if the strain was isolated more than one week after hospitalization.

Microbiological specimens were collected when the attending physician suspected infection based on systemic signs (unexplained fever, chills, and hypotension), and/or local signs (purulent tracheal aspirates in mechanically ventilated patients, purulent urinary drainage, or pus or pain at a vascular catheter insertion site). Microbiological specimens were collected as recommended by the CDC. Specimens consisted of blood for bacteremia/septicemia, urine for urinary tract infection, a bronchoalveolar lavage fluid or endotracheal aspirate for ventilator associated pneumonia and purulent discharges, aspirated pus or drain fluid for surgical site infection. *P. aeruginosa* isolated from clinical specimens were identified using conventional methods as well as commercial identification kits, API 20NE (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

The relationship between CRPA strains and the previous antibiotic therapy was assessed. The antibiotics were grouped as carbapenems, third-generation cephalosprins, quinolones, and others. Previous antibiotic therapy was defined as any systemic antibiotic given at least seven days within 3 months preceding the isolation of the organism. In cases of recurrent episodes of *P. aeruginosa* infections, only the first event was entered into the database.

Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial drug susceptibility was determined using the disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) [9]. Ten antibiotics were tested, including ticarcillin, piperacillin, ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, imipenem, aztreonam, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, and colistin. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a wild-type susceptible control.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem were determined using an Etest-strip (AB BioMérieux, France), as described by the manufacturers' instructions.

Phenotypic detection of the carbapenemase production

The phenotypic detection of the carbapenemase production was performed by the modified Hodge test by using an imipenem disc (10 μ g) as was described by CLSI. The detection of metallo- β -lactamase production was also performed by the combined-disc test by using two imipenem discs (10 μ g), one containing 10 μ L of 0.1 M (292 μ g)

anhydrous EDTA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), which were placed 25 mm apart on a MH agar plate. An increase in the zone diameter of >4 mm around the imipenem-EDTA disc as compared to that of the imipenem disc alone was considered as positive for metallo- β -lactamase production.

Phenotypic detection of the AmpC and ESBL production in CRPA isolates

Extended spectrum β -lactamase (ESBL) production was detected by the double-disc synergy test (DDST) using clavulanic acid-ticarcillin (20/10 mg) and ceftazidime (30 mg) and aztreonam (30 mg) on MH agar as described by Hakemi Vala et al. [10]. Phenotypic detection of ESBLs can be obscured by the chromosomal AmpC cephalosporinase in *P. aeruginosa*, hence cloxacillin-containing DDST was performed. Cloxacillin (250 μ g/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) was added in MH agar to inhibit cephalosporinase activity [11].

AmpC overproduction was confirmed according to the method of Rodríguez-Martínez et al. [11]. The isolates were considered as AmpC overproduction when there was at least a twofold dilution difference between the MICs of ceftazidime, imipenem and the MICs of ceftazidime, imipenem plus cloxacillin [11].

Preparation of DNA template for PCR

Total DNA was extracted by suspending a few colonies of overnight culture of *P.aeruginosa* isolates growing on Luria Bertani agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in 500 μ L of DNase- and RNase-free water (Invitrogen, Paisley, UK). The suspension was boiled at 100 °C for 10 min in thermal block (Polystat 5, Bioblock Scientific, France), then centrifuged at 19000 x g for 5 min. An aliquot of 1 μ L of the supernatant was used as the DNA template for PCR.

Detection of β -lactamases encoding genes

All CRPA isolates were screened by PCR for the following carbapenem hydrolysing enzymes encoding genes: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} and others β -lactamases : *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SPE-1} and *bla*_{OXA-1} as described previously [8, 12, 13]. CRPA resistance to ceftazidime antibiotic was further tested by using primers specific for plasmid mediated AmpC β -lactamase encoding genes as described by Pérez-Pérez and Hanson [14].

Detection of class 1 integrons

PCR was performed using primers CS-3' and CS-5' to amplify different fragment size of class 1 integrons. The primers, PCR conditions and reaction mixtures used were as described previously [12].

Detection of plasmid-mediated quinolone resistant, and aminoglycoside resistant- genetic determinants

The assessment of plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) and aminoglycoside resistant determinants carried by CRPA was conducted as described previously [13, 15]. All CRPA strains were screened by multiplex PCR for *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*). PCR amplification of *aac(6')-Ib* encoding aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type *Ib* enzyme and *aac(3)-II* encoding 3-N-aminoglycoside acetyltransferases genes was performed using primers that amplify all variants.

Sequencing of resistance genes

All amplified products obtained were sequenced to validate their identities. Both strands of the purified amplicons were sequenced with a Genetic Analyzer 3130x1 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the same primers used for PCR amplification. The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with the software available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Genotyping of CRPA isolates by Pulsed-field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed according to the standardized protocol developed by Durmaz et al. [16] using *SpeI*. The Dice similarity coefficient was calculated between pairs of lanes, and the strains were grouped, using the dendrogram construction utility Dendro UPGMA (Biochemistry and Biotechnology Department, Rovira Virgili University, Tarragona, Spain) (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>). The isolates were considered to be genetically related if the Dice coefficient of correlation was 80 % or greater.

Analysis of data

To identify variables associated with CRPA, a risk factor analysis was performed using a case-control study format. Demographics and hospitalization variables of CRPA case patients were compared with patients with carbapenem susceptible *P. aeruginosa* (CSPA). Data were entered into a database using the SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, USA). The χ^2 test and the independent samples *t* test were used for categorical and continuous variables, respectively. A stepwise multivariate logistic regression was conducted to examine the association of risk factors controlling for potential confounders. The logistic model included all variables for which a *p* value of <0.1 was obtained in the multivariate analysis. A *p* value of <0.05 was considered as significant.

Results

A total of 80 patients were included in this study and distributed in 40 % female and 60 % male (M:F ratio was 1.5). Fifteen patients presented CRPA infection (18.75 %; 95 % confidence interval: 10.2-27.3) and 65 patients had CSPA infection. The median age was 45 years-old in the CRPA group, and 51 in the CSPA group, with no significant difference, using parametric (for mean) or non-parametric (for median) tests. The duration of hospitalization was different between the groups, although it had a tendency to be prolonged in the CRPA group, with a median of 63.44 ± 48.82 days in the CSPA group and 82.5 ± 45.82 days in the CRPA group. The infected patients were hospitalized in various hospital units with the majority of patients from the endocrinology (55 %), followed by the patients from the otorhinolaryngology (18.75 %) and surgery (11.25 %) wards, while the rest of the patients were from various other hospital wards. According to anatomical location, the infections caused by *P. aeruginosa* were divided into infections of skin, surgical site infections, and soft tissues (70 %), respiratory tract infections (17.50 %), urinary tract infections (11.25 %), and bloodstream infections (1.25 %). All the clinical data are detailed in the Table 1. Even though several variables were compared, the urinary catheter use, previous use of antibiotics, and co-infection by *Staphylococcus aureus* were statistically significant. In the multivariate analysis none of the risk factor for CRPA was identified. The treatment of *P. aeruginosa* infection was incorrect in 57 of 80 patients (71.20 %) (Table 2). The mortality of patients with *P. aeruginosa* infection was 1.53 % for patients with CSPA and 13.34 % for patients with CRPA, without statistical significance.

The antimicrobial susceptibility testing was done by disc diffusion method to 80 clinical isolates of *P. aeruginosa*. The resistant rates for β -lactam antibiotics including ticarcillin, ceftazidime, ticarcillin/clavulanic acid, aztreonam and piperacillin were 61.25 %, 56.25 %, 56.25 %, 41.25 % and 36.25 %, respectively. The resistant rates for non- β -lactam antibiotics including ciprofloxacin, colistin and gentamicin were 43.75 %, 25 %, and 21.75 %, respectively. The degrees of antibiotic resistance for all antibiotics tested were significantly higher in the CRPA isolates, compared with CSPA isolates (Table 3). Colistin and amikacin were the most effective antibiotics against CRPA isolates with a susceptibility of 93.90 % and 100 % respectively. CSPA isolates were significantly more susceptible to ticarcillin/clavulanic acid (51.56 % vs. 7 %), aztreonam (70.31 % vs. 7 %), gentamicin (46.66 vs. 15.38 %) and ceftazidime (50 % vs. 13 %) compared to CRPA isolates.

The MIC values for the imipenem varied widely among the CRPA isolates. The ranges of the MIC values were 8- > 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 1). MBL screening with EDTA and modified Hodge test was negative in all isolates. PCR analysis was performed for all the CRPA isolates.

Table 1 Characteristics of patients infected with carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*

| Variable | CRPA (n = 15) | CSPA (n = 65) | p-value |
|---|------------------|-------------------|---------|
| Age-years | | | |
| Mean | 47.54 \pm 12.7 | 47.45 \pm 20.88 | 0.5 |
| Gender-n (%) | | | |
| Female | 5(33.34) | 27(41.53) | 0.57 |
| Male | 10(66.66) | 38(58.46) | 0.60 |
| Sexe-ratio | 0.5 | 0.68 | |
| Duration of hospitalization-days | 82.5 \pm 45.82 | 63.44 \pm 48.82 | 0.04 |
| Ward | | | |
| Otorhinolaryngology | 0 | 15(23.07) | 0.06 |
| Endocrinology | 9(60) | 36(53.85) | 0.74 |
| ICU-surgery | 3(20) | 6(9.23) | 0.36 |
| ICU-medecin | 0 | 4(6.15) | 1 |
| Outpatient | 3(20) | 4(6.15) | 0.12 |
| Source | | | |
| Diabetic ulcers | 9(60) | 47(70.76) | 0.34 |
| Urine | 4(26.66) | 5(7.7) | 0.08 |
| Blood | 1(6.66) | 0 | 0.18 |
| Aspiration tracheal | 1(6.66) | 13(20) | 0.45 |
| Coexisting diseases | | | |
| Trauma | 3(20) | 6(9.23) | 0.36 |
| Diabetes mellitus | 7(46.66) | 35(53.85) | 0.5 |
| Otitis | 0 | 7(10.77) | 0.03 |
| Respiratory disease | 0 | 4(6.15) | 1 |
| Renal disease | 0 | 2(3.07) | 1 |
| Other | 0 | 6(9.23) | 0.5 |
| Previous antibiotics use | 11(73.34) | 59(90.76) | 0.03 |
| Cephalosporin (third-generation) | 10(66.67) | 44(67.69) | 1 |
| Aminoglycoside | 1(6.66) | 12(18.46) | 0.4 |
| Fluroquinolone | 0 | 2(3.07) | 1 |
| Without antibiotic therapy | 4(26.66) | 7(10.77) | 0.2 |
| Invasive devices | 3(20) | 12(18.46) | 1 |
| Urinary catheter | 3(20) | 2(3.07) | 0.04 |
| Intubation | 0 | 5(7.7) | 0.5 |
| Intubation + urinary catheter | 0 | 5(7.7) | 0.5 |
| Polymicrobial infection | 9(60) | 33(50.77) | 0.5 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1(6.66) | 1(1.53) | 0.3 |
| <i>S. aureus</i> | 5(33.34) | 6(9.23) | 0.01 |
| <i>E. coli</i> | 2(13.33) | 8(12.30) | 1 |
| <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> | 1(6.66) | 4(6.15) | 1 |
| <i>S. aureus</i> + <i>P. mirabilis</i> | 0 | 10(15.38) | 0.19 |
| <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> | 0 | 3(4.61) | 1 |
| Mortality | 2(13.33) | 1(1.53) | 0.09 |

CRPA:carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA: carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*

Table 2 β -lactams administered to patients

| β -lactams | Patient infected by CRPA | Patient infected by CSPA | p-value |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| Cephalosporin (third-generation) | | | |
| Cefotaxime (calforan [®]) | 10 | 42 | 0.9 |
| Cefexime | 0 | 1 | 1 |
| Ceftriaxone | 0 | 1 | 1 |
| Carbapenem | | | |
| Imipenem (Teinam [®]) | 3 | 0 | 0.005 |

CRPA:carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA: carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*

None of the isolates gave positive PCR results for carbapenemase encoding genes; *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51}. Synergy tests were performed using clavulanic acid-ticarcillin-, aztreonam-, and ceftazidime-containing disks did not give evidence of any inhibition of aztreonam and ceftazidime resistance for all the CRPA isolates, ruling out the production of ESBL. PCR detecting of carbenicillinase encoding gene *bla*_{PSE-1} was positive in two isolates (P.a29 and P.a30). AmpC over-expression was previously reported to be highly correlated with ceftazidime resistance. We found that AmpC over-expression was present in 62 % of CRPA isolates and none gave positive PCR results for plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes. Among seven gentamicin resistant CRPA isolates, five harboured *aac(3)-II* encoding 3-N-aminoglycoside acetyl-transferases gene (P.a1, P.a2, P.a18, P.a29, P.a30). The plasmid-mediated quinolone resistance genes, was not found in the examined isolates. The class 1 integron (*Int1*) was detected in two isolates (P.a29 and P.a30) with PCR amplicons 1 kb in length. Sequence analysis of

Table 3 Comparison between CRPA and CSPA on the susceptibility of antibiotics tested

| Antibiotics | Proportion of resistance (%), (No. of resistant strains) | | p-value |
|--------------------------------|--|--------------|---------|
| | CRPA | CSPA | |
| Ticarcilline | 100 % (15) | 53 % (34) | >0.0001 |
| Ticarcilline + clavulanic acid | 93 % (14) | 48.44 % (31) | 0.001 |
| Ceftazidime | 87 % (13) | 50.00 % (32) | 0.008 |
| Aztreonam | 93 % (14) | 29.69 % (19) | >0.0001 |
| Piperacilline | 87 % (13) | 25.00 % (16) | >0.0001 |
| Ciprofloxacin | 100 % (15) | 31.25 % (20) | >0.0001 |
| Colistin | 7 % (4) | 24.61 (16) | 1 |
| Amikacin | 0 % | 0 % | |
| Gentamicin | 46.66 % (7) | 15.38 % (10) | 0.007 |

CRPA:carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, CSPA: carbapenem-susceptible *P. aeruginosa*

these amplicons revealed the presence of the *aadA7* gene cassette.

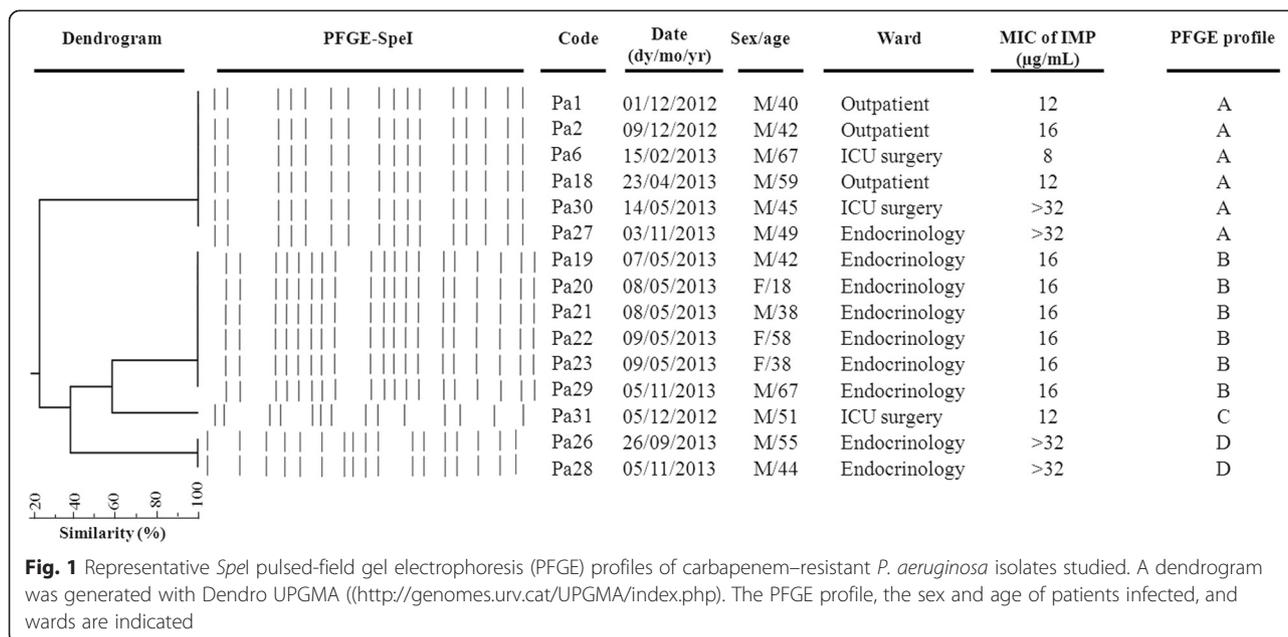
In the genotyping analysis, the DNA fingerprint patterns of the 15 carbapenem-resistant isolates revealed four distinct clones, as shown in Fig. 1. One of these clones was represented by a single isolate (isolate P.a31, clone C). The other two clones were represented by six (clone A and B), and two (D) isolates, respectively. Clone A and B were isolated from two different hospitals. Clone A came from two different wards outpatients and ICU wards, showing a wide MIC range (8- > 32 μ g/mL), and clone B which exclusively came from endocrinology ward, showed a homogeneous MIC value (16 μ g/mL).

The combination of PFGE results with hospital overlap data in each ward, demonstrated from patient -to-patient transmission in 8 (53.34 %) patients at endocrinology ward (clone B and D). In contrast, the same isolates of other clones were found in patients hospitalized in the same ward within a few months of each other, indicating that the persistence of the clone at the ward or hospital is still existing.

Discussion

Carbapenems are among the best choices for the treatment of infections caused by multi-drug-resistant *P. aeruginosa* (MDR- *P. aeruginosa*) isolates [1]. In recent years, Algeria has been considered among the countries that reported high rates of antimicrobial resistance [7, 8, 17]. In the present study, there were high levels of resistance to all commercially available antimicrobial agents among *P. aeruginosa* isolated from Annaba Hospital; the rate of 18.75 % CRPA isolates, this rate of carbapenem resistance reflects a threat limiting the treatment options in our hospitals. The rates of CRPA isolates varied by geographic region, specimen source, and selective pressure from antibiotics [18]. In Algeria, Drissi et al. [17] concluded that *P. aeruginosa* isolates exhibited the highest resistance levels to imipenem (35 %) in the period between 2005–2007. Also Sefraoui et al. [8] showed that among *P. aeruginosa* strains 39.32 % were resistant to imipenem during the period 2009–2012. However, the CRPA frequency shown in the studied hospitals during the period 2012–2013 was lower than those reported in Algeria. Among the neighboring countries, such as Libya, Tunisia and Egypt the occurrence of imipenem resistant *P. aeruginosa* was reported often and it ranged between 24.2 % and 39.34 % [19–21].

In our study, CRPA were more resistant to multiple drugs than CSPA isolates, and the most effective antibiotic against CRPA isolates was amikacin and colistin. These findings indicate that amikacin and colistin has increasingly become the last viable therapeutic option for MDR-*Pseudomonas* infections. The high percentage of co-resistance to carbapenem and fluoroquinolone is relevant among the studied CRPA, highlighting the percentage of resistance to ciprofloxacin (100 %) that was



higher than other previous studies [8, 17, 21]. Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* strains may result from multiple mechanisms with or without the production of carbapenemase [1]. Loss or under expression of porin OprD is the most common mechanism of resistance to carbapenems and is frequently associated with efflux pumps and/or AmpC over expression [1, 22]. In our study, none of the CRPA isolates found were positive for carbapenemase-producing genes, and the MIC values for imipenem ranged between 8- >32 µg/mL. These results suggested the presence of other mechanisms such as over-expression of the efflux pump or loss of outer membrane porin. In addition, the mutational disruption of *oprD* is the major emerging mechanism of carbapenem resistance among *P. aeruginosa* isolates in Algeria [7, 8]. Several previous studies have examined the occurrence of aminoglycoside resistance mechanisms in *P. aeruginosa* isolated from different countries [1, 23, 24]. In our study, the rate of gentamicin resistance found in CRPA (46.6 %) was much higher than the rate that has been reported previously in Annaba hospitals (28.09 %) [8]. The *aac(3)-II* was the only resistance gene observed in this study. This result was in accordance with what has been observed in different studies in other countries, in which the transferable aminoglycoside-modifying enzymes were the most frequent mechanisms in aminoglycoside resistance in *P. aeruginosa* [25, 1, 26]. The class I integron and carbenicillin hydrolysing β-lactamases of *Pseudomonas* specific enzyme (PSE-1) type were found in two CRPA isolates. These class I integrons may play an important role in the development of antimicrobial resistance and emergence of MDR- *P. aeruginosa* [27].

The risk factors for acquiring CRPA may be related to the host condition, infection control practice, and antimicrobial consumptions [28–30]. Regarding invasive procedures, in our study urinary catheter is hypothesized to be a risk factor for CRPA- infection. This was not surprising, given that *P. aeruginosa* tends to make biofilm on the surface of urinary catheters, and they increase the risk of translocation of organisms to the urinary tract, causing infection [18, 30, 31]. These results highlight the need for improved measures to control nosocomial infection and show that the manipulation of invasive devices is one of the main procedures that require intervention measures.

The length of hospital stay before isolation of CRPA was also reported as the risk factor in this study. This result is consistent with many studies evaluating the relationship between acquisition of CRPA infection and the length of stay [28, 30, 32, 33]. One possible explanation for these findings is that patients who are in hospital for longer periods of time have increased exposure to nosocomial pathogens and, subsequently, are at increased risk of being colonized by these organisms [28–30, 32].

A clonal dissemination of CRPA isolates with the presence of two important CRPA clones were observed in this study. In our study, we defined cases of patient-to-patient transmission on the basis of isolates with similar PFGE patterns and an overlap in hospital stay. These cases which were observed in 53.34 % patients at endocrinology ward (clone B and D), suggest that patient-to-patient transmission is an important dissemination mechanism and has contributed to the increased rate of resistance to carbapenems. The patients admitted in endocrinology wards often have compromised immune systems (all patients harboured

diabetes mellitus disease) receiving excessive manipulation (such as catheterization, intubation, blood collection, etc.) and a high antimicrobial intake, which could have been predisposing factors for infections and the spread of resistant bacteria [30].

In parallel with other services presented in this study, the spread of the pathogen can be explained by the fact that in hospitals where the most serious infections occur, *Pseudomonas* can be spread too, on the hand of healthcare workers or by an equipment that gets contaminated and is not properly cleaned. These results suggest an exogenous, preventable acquisition of *P. aeruginosa*, which should stimulate research on policies of premises decontamination and their impact on *P. aeruginosa* acquisition.

The differences between services can be explained by differences in patient population and by differences in the implementation of general measures of hygiene to control cross-transmission between patients.

Patients in the current study were already hospitalized in other wards and other hospitals; the movements of patients between different hospital wards must therefore also be considered.

Limitations

As with any retrospective study, our study is not without limitations, for the nature of retrospective design, the diagnosis and management of sepsis and antibiotic choice were based on individual clinicians' opinions. Our data were collected from a single site, so institutional differences in prescribing patterns, antibiotic formularies, and patient populations may affect the applicability of our results to other institutions. On the other hand, because active surveillance was not performed over the study period, we cannot ensure that control patients did not harbour CRPA. Our small sample size was another limitation; it may have limited the detection of other risk factors. Finally, the completed molecular characterization of carbapenem resistance mechanisms in CRPA isolated in this study, such as the membrane permeability and efflux mechanisms should be investigated.

Conclusion

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first report to identify risk factors in Algeria for *P. aeruginosa* resistant to carbapenem. Our study confirmed that the length of hospital stay is the major risk factor for CRPA, as the same presence of invasive devices.

In addition, our result also demonstrate clonal dissemination of CRPA isolates, suggest cross-transmission as an important dissemination mechanism and has contributed to the increased rate of resistance to carbapenems. A clear understanding of risk and the mechanism of carbapenem resistance prevalent in a hospital is vital to devise tailor-

made intervention strategies also; effective empiric therapy for nosocomial infections can be rationally formulated.

Competing interest

The authors declare that there are no competing interests associated with this work.

Authors' contributions

MS and BA carried out the experimental part of the manuscript. MD participated in the acquisition of data. MS, BA, ZK, CH and TM participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Department of Biology, Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, Badji Mokhtar Faculty of sciences, Annaba University, Box 12 Sidi Amar, 23000, Annaba, Algeria. ²Molecular Bacteriology Laboratory, Pasteur Institute of Morocco, 1, Place Louis Pasteur, 20360, Casablanca, Morocco. ³Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, 1 Street Hospital, 20360, Casablanca, Morocco. ⁴Microbiology Laboratory, University Hospital Ibn Rochd, 23000, Annaba, Algeria.

Received: 23 February 2015 Accepted: 4 June 2015

Published online: 12 June 2015

References

- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2:65. doi:10.3389/fmicb.2011.00065.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011;35(5):736–55.
- Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011;35(5):820–55. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *The Lancet Infectious Diseases*. 2011;11(5):381–93.
- Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int*. 2014;305784(10):13.
- Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM, Davies TA, Jones RN. Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* Complex and Enterobacteriaceae Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and Detection of Two Novel beta-Lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(12):7358–66.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2426–7. doi:10.1128/AAC.00032-13. Epub 2013 Mar 4.
- Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*. 2014;20(2):156–61.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards*. 2012;32(2):188.
- Hakemi Vala M, Hallajzadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, et al. Detection of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2014;27(1):8–13.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(11):4783–8. doi:10.1128/AAC.00574-09.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(3):440–58. doi:10.1128/CMR.00001-07.
- Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases

- among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *The Journal of Antibiotics*. 2013;66(1):11–6. doi:10.1038/ja.2012.91.
14. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(6):2153–62.
 15. Barguigua A, El Otmami F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in the Moroccan community. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;73(3):290–1. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.03.011.
 16. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(5):372–7.
 17. Drissi M, Ahmed ZB, Deheq B, Bakour R, Plesiat P, Hocquet D. Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Medecine et maladies infectieuses*. 2008;38(4):187–91.
 18. Morrow BJ, Pillar CM, Deane J, Sahm DF, Lynch AS, Flamm RK, et al. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;75(4):412–6.
 19. Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghazzi R, Saidani M, Amine S, Ben Redjeb S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol*. 2011;6(106):1746–596.
 20. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;101635(10):23.
 21. Rishi MB, Jrad SJ, Al-Gumati MA, Aboshkiwa MA. Nosocomial Infections in a Surgical Department. Tripoli, Libya: Tripoli Central Hospital; 2013. vol 6. 2013.
 22. Rodriguez-Martinez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(11):4783–8. doi:10.1128/aac.00574-09.
 23. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2010;29(11):1349–53.
 24. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(6):951–3.
 25. Poole K. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(2):479–87. doi:10.1128/aac.49.2.479-487.2005.
 26. Dubois V, Arpin C, Dupart V, Scavelli A, Coulange L, André C, et al. β -Lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(2):316–23. doi:10.1093/jac/dkn174.
 27. Odumosu BT, Adeniyi BA, Chandra R. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2013;12:29. doi:10.1186/1476-0711-12-29.
 28. Joo EJ, Kang CI, Ha YE, Kang SJ, Park SY, Chung DR, et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: clinical impact of antimicrobial resistance on outcome. *Microbial drug resistance*. 2011;17(2):305–12.
 29. Lin KY, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014;21(14):00008–5.
 30. Rao GG. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs*. 1998;55(3):323–30.
 31. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*. 2010;300(6):371–9.
 32. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vazquez GJ, Sante MI, Aquino EE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(4):1660–4.
 33. Lin MF, Huang ML, Lai SH. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. *The Journal of Hospital Infection*. 2003;53(1):39–45.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





ANNEXES

Annexe 1

1-Préparation des galeries : [97]

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la bactérie sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

2-Préparation de l'inoculum : [97]

Ouvrir une ampoule de suspension Medium (5ml) et réaliser une suspension homogène avec la colonie isolée sur milieu gélosé.

3-Inoculation de la galerie : [97]

- Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP et GEL.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une atmosphère anaérobie dans les tests : ADH, LDC, ODC, H2S et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18-24h.

5- Composition du milieu Api 20 NE :

Tableau : composition de la galerie Api 20 NE

| | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------|
| Api aux Médium 7 ml | Sulfate d'ammonium | 2g. |
| | Agar | 5g. |
| | Solution de vitamine | 10,5 ml. |
| | Solution d'oligo-éléments | 10ml. |
| | Phosphate monosodique | 6,24g. |
| | Chlorure de potassium | 1,5g. |
| | Eau déminéralisée | 1000ml. |
| | pH = 7 – 7,2 | |

6- Lecture du système Api 20NE

Tableau: Catalogues analytique de l'Api 20NE

| Tests | COMPOSANTS ACTIFS | Qté mg/ cupule | Réaction/enzyme | Résultats | |
|------------|---|-------------------|--|--|----------------------|
| | | | | négatif | positif |
| NO3 | Potassium nitrate | 0,136 | Réduction du nitrate en nitrite | Nit 1+ Nit 2/5minutes incoloré rose rouge | |
| | | | Réduction du nitrate en azote | Zn / 5 minutes Rose incoloré | |
| TRP | L. tryptophane | 0,2 | Formation d'indole (tryptophane) | Incoloré Vert pale/jaune | rose |
| <u>Glu</u> | D. glucose | 1,92 | Fermentation (glucose) | Bleu vert | jaune |
| <u>ADH</u> | L. arginine | 1 ,92 | Arginine dihydrolase | jaune | Orange rose rouge |
| <u>URE</u> | Urée | 0,76 | Uréase | jaune | Orange rose rouge |
| ESC | Esculine citrate de fer | 0,52 0,072 | Hydrolyse (β glucosidase) (esculine) | jaune | Gris marron noir |
| Gel | Gélatine (origine bovine) | 0,6 | Hydrolyse (protéase) (gélatine) | Pas de diffusion du pigment | Diffusion du pigment |
| PMPG | 4-Nitrophénol- β -D-galactopiranoside | 0,22 | B galactosidase (paranitrophényl β D galactopiranosidase) | incoloré | jaune |
| <u>Glu</u> | D glucose | 1,56 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>Ara</u> | L arabinose | 1,4 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>MNE</u> | D MANOSE | 1,4 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>MNA</u> | D Mannitol | 1,36 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>NAG</u> | N Acetylglucosamine | 1,28 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>MAL</u> | D MALTOSE | 1,4 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>GNT</u> | Potassium gluconate | 1,84 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>CAP</u> | AC caprique | 0,78 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>Adi</u> | AC adipique | 1,12 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>MLT</u> | AC malique | 1,56 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>CiT</u> | Tri sodium citrate | 2,28 | Assimilation | transparence | trouble |
| <u>paL</u> | AC phénylacétique | 0,8 | Assimilation | transparence | trouble |

Annexe 2

3. Identification par API 20 NE des caractères biochimiques des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*

| Caractères biochimiques | NO3 | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC | OX |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + | - | - | + | +/- | - | + | - | + | - | - | +/- | +/- | - | + | + | + | + | + | - | + |

Annexe 3

Technique de Vitek2 pour détermination des concentrations minimales inhibitrices

Plan :

1. Préparation de la cassette
2. Accès à l'application Vitek 2 Compacte
3. Les méthodes de travail
 - Mode post saisie (load & go)
 - Mode cassette virtuelle

I - Préparation et standardisation de l'inoculum

Avec une pipette, sélectionner des colonies isolées et les mettre en suspension homogène dans 3 ml de solution saline.

Standardiser cette suspension bactérienne selon les méthodes appropriées en utilisant le DensiChek Plus (inoculum de 0,5 à 0,63 Mac Farland pour les bactéries GRAM négatifs).

II – Préparation de la suspension pour l'antibiogramme

En utilisant les pipettes manuelles fournies avec le système, transférer la quantité préconisée (145µl pour les GRAM négatifs) dans un second tube contenant 3 ml de solution saline.

Puis placer les cartes sur la cassette en plongeant leurs pailles de transfert dans les tubes.

Refaire les étapes sus cités pour les autres échantillons avant de charger la cassette dans le Vitek 2 Compact.

Remplissage et chargement des cartes dans le Vitek 2 Compact

Placer les cartes ID et/ou AST sur une cassette.

Imprimer la feuille de travail vierge, et noter les informations concernant la cassette (ID échantillons & code à barres des cartes).

Charger la cassette dans l'instrument (chambre d'inoculation) puis fermer la porte.

S'assurer dans l'interface utilisateur de l'instrument :

- Lancer remplissage, prêt
- Etat de l'instrument, OK

A ce moment appuyer sur le bouton « Lancer remplissage »

Un voyant lumineux indique au bout de 70 secondes que le cycle de remplissage est terminé.

Retirer la cassette de la chambre d'inoculation puis ouvrir la porte du lecteur-incubateur, placer la cassette à l'intérieur (dans un délai maximum de 10 minutes) puis refermer la porte.

Un voyant lumineux indique que le chargement des cartes est terminé.

Retirer la cassette vide du lecteur-incubateur.

L'instrument lit les codes à barres des cartes et de la cassette, et envoie automatiquement les informations au logiciel.

L'étape de réconciliation

L'instrument compare les codes à barres des cartes chargées dans l'instrument avec ceux entrés dans le logiciel en cassette virtuelle.

Si la réconciliation, c'est à dire la comparaison est correcte, l'instrument émet un son «happy Song »

S'il y a discordance entre la cassette virtuelle et la cassette chargée, la cassette passe en rouge, et les cartes n'apparaissent pas dans le menu « gestion des résultats ».

Annexe 4

Les antibiotiques testés pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Bio-Rad, France ; HIMEDIA, Inde ; OXOID, Royaume-Uni ; Bioanalyse, Turquie).

| Antibiotiques | Abréviation | Charge du disque | Familles | |
|----------------------------------|-------------|------------------|-----------------------------------|--------------|
| Céftazidime | CAZ | 30µg | Céphalosporine de 3ème génération | β-lactamines |
| Céfépime | FEP | 30µg | Céphalosporine de 4ème génération | |
| Cefpirome | CPO | 30µg | | |
| Imipénème | IMP | 10µg | Carbapénèmes | |
| Aztréonam | ATM | 5µg | Monobactames | |
| Ticarcilline | TIC | 75µg | Carboxpénicilline | |
| Ticarcilline/ Acide clavulanique | TCC | 85µg | | |
| Pipéracilline | PIP | 100µg | Uréidopénicilline | |
| Pipéracilline/Tazobactam | PTZ | 85µg | | |
| Tobramycine | TM | 30µg | Aminosides | |
| Amikacine | AK | 10µg | | |
| Gentamicine | GM | 10µg | | |
| Ciprofloxacine | CIP | 5µg | | |
| Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole | SXT | 25µg | Sulfamides | |
| Colistine | CS | 50µg | Polymixines | |
| Fosfomycine | FOS | 50µg | Fosfomycines | |

Annexe 5

Valeur des concentrations minimales inhibitrices des souches de *P.aeruginosa* productrices de MBL

| Souche/ATB | TIC | TCC | PIP | PTZ | CAZ | CFP | IMP | MEP | AK | GM | TM | CIP | LEV | CL | SXT |
|------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|------|
| 04 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥64 | ≥32 | ≥16 | ≥64 | ≥64 | ≥16 | 0.5 | 1 | 2 | ≥320 |
| 08 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | 0.25 | 1 | 2 | ≥320 |
| 09 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥64 | ≥16 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | 0.5 | 1 | 2 | ≥320 |
| 10 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | 32 | 4 | ≥16 | 0.5 | 1 | 2 | ≥320 |
| 11 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | 16 | 32 | ≥16 | ≥16 | ≥64 | 8 | ≥16 | 0.5 | 1 | 2 | ≥320 |
| 12 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | 32 | ≥32 | ≥16 | ≥64 | 8 | ≥16 | 0.25 | 1 | 2 | ≥320 |
| 27 | ≥128 | ≥128 | 16 | 32 | 64 | 64 | 64 | 16 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | ≥16 | ≥8 | 2 | 160 |
| 30 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | ≥128 | 16 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | ≥64 | ≥16 | ≥16 | 0.5 | 1 | 2 | ≥320 |