

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE D'AMELIORATION GENETIQUE DES PLANTES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

THEME

La colistine en association dans le traitement des infections à bacilles à Gram négatif multirésistants

Présentée par : M^{elle} Meliani Saida

Directeur de thèse : Djahoudi Abdelghani

Prof., Université d'Annaba

Membres de Jury:

Présidente : Mme Akila Abdi

Prof., Université d'Annaba

Examineurs : Mme Noujoud Grara

Prof., Université de Guelma

Mme Houneida Benbouzid

MCA, Université d'Annaba

Mr. Djamel Eddine Benouarth

Prof., Université de Guelma

N° DBCH...../2021

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Un remerciement chaleureux à mon encadreur le Professeur **Abdelghani Djahoudi**, qui m'a guidée tout au long de ce travail. Merci pour le temps consacré à m'encadrer, souvent pris sur son temps personnel. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, ses conseils et remarques pertinentes et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais.

Je souhaite également exprimer ma vive reconnaissance à madame **Akila Abdi**, Professeur à l'Université d'Annaba. C'est un grand honneur et plaisir pour moi que vous acceptiez de présider le jury de ma thèse. Connaissant votre grande rigueur, sérieux et abnégation.

Pour vous madame le **Professeur Noujoud Grara**, de l'Université de Guelma, j'exprime un grand merci d'avoir accepté de vous déplacer, participer au jury et examiner mon travail malgré vos occupations. C'est pour moi un honneur, vos remarques me seront d'une grande aide.

A madame le **Professeur Hounaida Benbouzid**, de l'Université d'Annaba qui me fait l'honneur de participer au jury et d'examiner ma thèse, je dis ma sincère gratitude, votre appréciation me servira certainement dans mes entreprises futures. Sincères remerciements.

Je veux exprimer mes profonds respects à Monsieur **Djamel Eddine Benouareth**, Professeur à l'Université de Guelma ayant voulu participer à ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements vont aussi au **Docteur Samira Ait Kaki**, **Professeur Khaled Deghdegh** et le **Professeur Kamel Amoura** pour leurs aides, leurs conseils très précieux et ses encouragements.

Je remercie aussi les médecins chefs de service des grandes brûlées, de réanimation-anesthésie, d'endocrinologie et d'urologie pour leurs compréhension et de m'avoir permis accéder au service pour la réalisation de prélèvement.

*J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail (**Heythem Djahoudi, Soumaya Toumi, Sonia Heni, Faisa Baghloul, Hadjer Kadri, Sabrina Alioua, Ghozlene Aouadi**).*

Je tiens à remercier également:

*Mon **très cher Père**, l'exemple du courage, du dévouement, de l'honnêteté, de la persévérance et du sacrifice. Tu m'as appris comment, affronter la vie, et c'est grâce à tes enseignements des valeurs et du devoir que j'ai pu m'épanouir. En ce jour ta fille espère réaliser l'un de tes plus grands rêves, et couronner tes années de sacrifices et d'espairs. Tu es toujours présent dans mon cœur, tu étais et tu resteras mon premier exemple.*

*A ma **très chère Mère**, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse, tu n'as jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucun remerciement ne saurait être assez éloquent pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices consentis depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait tout ce qui est en ton pouvoir pour que tes enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Fière que tu sois prêt de moi pour ce grand jour. Je t'aime.*

*Mon frère **Tarek** et mes sœur **Houda** et **Nesrine** qui m'ont toujours encouragée et aidée dans toutes les recherches de mon parcours avec beaucoup de dévouement de tendresse et surtout d'amour et d'affection, qui ont toujours éclairé mon chemin.*

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'exécution de ce travail.

Résumé

Sur une période de cinq années 143 souches de bacilles à Gram négatif multirésistants de 380 mis en cause dans des infections. Ces souches sont isolées de 900 prélèvements pris chez des patients hospitalisés dans différents services du CHU Annaba.

Le service des grands brûlés est le plus concerné par ce type de bactéries représentées surtout par des espèces du genre *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Les entérobactéries multirésistantes isolées sont issues essentiellement des services d'urologie et d'endocrinologie.

La multirésistance des souches isolées est de manière spécifique vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération, des carbapénèmes, de la gentamicine et la ciprofloxacine. Une sensibilité à la colistine est détectée chez toutes les souches de BGN multirésistantes. Cependant une résistance intermédiaire est révélée chez 12 souches de *P.aeruginosa*.

On y trouve des gènes de résistance aux β -lactamines type CTX-M, TEM, HSV, OXA-23, OXA-24, NDM-1 et VIM-2.

L'usage de la colistine en association à des concentrations sub-inhibitrices révèle une activité de type synergique dans la majorité des cas. Elle est significative lors de l'association de la colistine avec l'imipénème aussi bien sur les bacilles à Gram négatif producteurs de BLSE et/ou de carbapénémases. Avec l'amikacine l'amélioration de l'activité est aussi de grande importance sur toutes les souches testées. L'activité est par contre meilleure sur les entérobactéries lorsqu'on associe la colistine à la ciprofloxacine.

Ainsi, la revalorisation des associations d'antibiotiques à base de la colistine peut constituer une issue pour la régulation et la diminution du risque d'apparition et de diffusion de la résistance des bacilles à Gram négatif aux antimicrobiens. Elle contribue aussi à la limitation du risque de toxicité de certaines molécules.

Mots clés : Antibio-résistance ; Bacilles à Gram négatif ; Colistine ; Associations.

Abstract

Over a period of five years 143 strains of multidrug-resistant Gram-negative bacilli out of 380 implicated in infections. These strains are isolated from 900 samples taken from patients hospitalized in various departments of the CHU Annaba.

The severe burns department is the most affected by this type of bacteria, mainly represented by species of the genus *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated mainly come from the urology and endocrinology departments.

The multidrug-resistance of the strains isolated is specific to third generation cephalosporins, carbapenems, gentamicin and ciprofloxacin. Sensitivity to colistin is detected in all multiresistant BGN strains. However, intermediate resistance is revealed in 12 strains of *P.aeruginosa*.

There are genes of resistance to β -lactams such as CTX-M, TEM, HSV, OXA-23, OXA-24, NDM-1 and VIM-2.

The use of colistin in combination at sub-inhibitory concentrations reveals synergistic-type activity in the majority of cases. It is significant during the combination of colistin with imipenem as well on Gram-negative bacilli producing ESBLs and / or carbapenemas. With amikacin the improvement in activity is also of great importance on all the strains tested. On the other hand, the activity is better on *Enterobacteriaceae* when colistin is combined with ciprofloxacin.

Thus, the upgrading of combinations of antibiotics based on colistin may constitute a way out for the regulation and reduction of the risk of the appearance and spread of resistance of Gram-negative bacilli to antimicrobials. It also contributes to limiting the risk of toxicity of certain molecules.

Keywords: Antibiotic resistance; Gram negative bacilli; Colistin; Combination.

ملخص

على مدى خمس سنوات، تم عزل 143 سلالة من العصيات سالبة Gram المتعددة المقاومة من أصل 380 سلالة متورطة في العدوى. تم عزل هذه السلالات من 900 عينة مأخوذة من المرضى المقيمين في أقسام مختلفة في المستشفى الجامعي عنابة.

قسم الحروق الشديدة هو الأكثر تضرراً من هذا النوع من البكتيريا ، وتتمثل بشكل رئيسي في البكتيريا من نوع *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* بينما تأتي *entérobactéries* المعزولة و متعددة المقاومة بشكل رئيسي من أقسام المسالك البولية والغدد الصماء.

المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في السلالات التي تم عزلها تخص على وجه التحديد الجيل الثالث من السيفالوسبورين (céphalosporines) والكاربابينيم (carbapénèmes) والجنتاميسين (gentamicine) والسيبروفلوكساسين (ciprofloxacin). تم الكشف عن الحساسية للكوليسيتين في جميع سلالات BGN متعددة المقاومة. باستثناء 12 سلالة من نوع *P. aeruginosa* تظهر عن مقاومة وسيطة للكوليسيتين (colistine).

هناك جينات مقاومة لـ β -lactamines مثل CTX-M ، TEM ، HSV ، OXA-23، OXA-24، NDM-1 و VIM-2.

يكشف استخدام الكوليسيتين بالاشتراك مع مضاد حيوي آخر بتركيزات مثبطة فرعية عن نشاط من النوع التآزري في اغلب الحالات. يكون مهمًا عندما يتم دمج الكوليسيتين مع الإيميبينيم (imipenème) على كل من السلالات المنتجة لـ BLSEs أو carbapénémases. مع أميكاسين ، فإن التحسن في النشاط له أهمية كبيرة أيضًا على جميع السلالات المختبرة. من ناحية أخرى ، يكون النشاط أفضل على *Enterobacteriaceae* عندما يتم دمج كوليستين مع سيبروفلوكساسين.

وبالتالي ، فإن تطوير توليفات المضادات الحيوية القائمة على الكولستين (colistine) قد يشكل مخرجًا لتنظيم وتقليل مخاطر ظهور وانتشار مقاومة العصيات سالبة Gram للمضادات الحيوية. كما أنها تساهم في الحد من مخاطر التسمم بجزئيات معينة.

الكلمات المفتاحية: مقاومة المضادات الحيوية ؛ عصيات سالبة الجرام ؛ كوليستين ؛ تركيبة .

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Introduction	
Partie 1 : Revue Bibliographique	
Chapitre I : Bacilles à Gram négatif multirésistants	1
1. Généralités	1
2. Bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs	1
3. Bacilles à Gram négatif aérobies stricts	9
Chapitre II : La colistine	16
1. Historique	16
2. Formes pharmaceutiques et indications	16
3. Structure chimique	17
4. Mécanisme d'action	18
5. Spectre d'activité	19
6. Les tests de sensibilité à la colistine	19
6.1. Méthodes de dilution	19
6.1.1. Méthode de dilution en milieu liquide	19
6.1.2. Méthodes de dilution en milieu solide	20
7. Mécanisme de résistance à la colistine	22
7.1. Résistance naturelle	22
7.2. Résistances acquises	22
7.2.1. Résistances chromosomiques	22
➤ Modification de lipopolysaccharide	22
➤ Modifications de la capsule polysaccharidique	26
➤ Implication des pompes d'efflux	27
7.2.2. Résistance plasmidique	27
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-1</i>	27
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-2</i>	28
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-3</i>	28
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-4</i>	28

➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-5</i>	29
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-6</i>	29
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-7</i>	29
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-8</i>	29
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-9</i>	30
➤ Gène de résistance plasmidique <i>mcr-10</i>	30
8. Emergence de la résistance à la colistine chez les bacilles à Gram négatif	30
Chapitre III : Associations d'antibiotiques à base de la colistine	33
1. Généralités	33
2. Intérêts de l'association d'antibiotiques	33
3. Types d'associations d'antibiotiques	35
4. Méthodes d'étude in vitro de l'activité antibactérienne des associations d'antibiotiques	36
4.1 Technique de référence : l'échiquier (checkerboard)	36
4.2. Méthode en cinétique de bactéricidie (time-killing)	36
4.3. Méthode E-test	38
5.4. Méthode de bandelettes perpendiculaire	38
5.5. Technique par diffusion avec transfert sur cellophane	39
5. La colistine en association sur les bacilles à Gram négatif multirésistants	40
5.1. Associations colistine- β -lactamines	40
5.2. Associations colistine- fluoroquinolones	41
5.3. Associations colistine- aminosides	42
5.4. Associations colistine- sulfamides	42
5.5. Associations colistine- rifamycines	42
5.6. Associations colistine- tétracyclines	43
5.7. Associations colistine- glycopeptides	43
Partie 2 : Matériels et méthodes	
1. Lieu et durée d'étude	45
2. Techniques de prélèvement	46
3. Acheminement de prélèvements	47
4. Isolement et identification des souches bactériennes	47
4.1. Identification par système API	48
4.2. La spectrométrie de masse MALDI-TOF	48
5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	50

6. Recherche phénotypique des enzymes de résistance aux β -lactamines	53
6.1. Production de β -lactamases à Spectre Etendu (BLSE)	53
6.1.1. Test de synergie	53
6.1.2. Test à la cloxacilline	54
6.2. Production de carbapénemases	54
6.2.1. Test de Hodge modifié	54
6.2.2. Production des metallo- β -lactamases	55
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par	55
7.1. E-test	55
7.2. Dilution en milieu liquide (macrodilution)	57
8. Détection moléculaire de gènes de résistance aux β -Lactamine	59
8.1. Extraction de l'ADN	59
8.2. Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Réaction en temps réel (RT-PCR)	60
8.3. Polymérase Chain Réaction (PCR) standard	63
8.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	64
8.5. Séquençage	65
8.6. Analyse des séquences	68
9. Associations des antibiotiques à base de la colistine	68
9.1. Technique de l'échiquier (cheeckerbord)	68
Partie 3 : Résultats et discussions	
1. Souches bactériennes	71
2. Identification des BGN multirésistants retenus	72
3. Résistance aux antibiotiques des BGN-MR retenues	77
3.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	77
3.2. Bacilles à Gram négatif non fermentaire retenus	85
4. Caractérisation phénotypique et génotypique des β -lactamases	89
4.1. β -lactamases à spectre élargi chez <i>Enterobacteriaceae</i>	89
4.2. Carbapénèmases chez les BGN-NF	94
5. Activité d'associations à base de colistine sur BGN multirésistants	99
5.1. <i>Enterobacteriaceae</i> productrices de β -lactamases	99
5.1.1. CMI de la colistine sur les <i>Enterobacteriaceae</i> productrices de β -lactamases	99

5.1.2. CMI de l'imipenem sur les <i>Enterobacteriaceae</i> productrices de β -lactamases	101
5.1.3. CMI de l'amikacine sur les <i>Enterobacteriaceae</i> productrices de β -lactamases	101
5.1.4. CMI de la ciprofloxacine sur les <i>Enterobacteriaceae</i> productrices de β -lactamases	102
5.2. BGN-NF producteurs de carbapénemases	102
5.2.1. CMI de la colistine sur les BGN-NF producteurs de carbapénemases	102
5.2.2. CMI de l'imipenem sur les BGN-NF producteurs de carbapénemases	105
5.2.3. CMI de l'amikacine sur les BGN-NF producteurs de carbapénemases	105
5.2.4. CMI de la ciprofloxacine sur les BGN-NF producteurs de carbapénemases	106
5.3. Associations proprement dites	106

Conclusion et perspective

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- A.baumannii-RC** : *Acinetobacter baumannii* résistant au carbapénème
- BET**: Bromure d’Ethidium
- BGN**: Bacilles à Gram négatif
- BGN-MR**: Bacilles à Gram négatif-multirésistants
- BGN-NF**: Bacilles à Gram négatif-Non fermentants
- BGT**: Bouillon glucosé tomponné
- BLSE**: β -Lactamase à Spectre Etendu
- BMR**: Bactérie multirésistants
- C3G**: Céphalosporines de 3^{ème} génération
- CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMB**: Concentration Minimale bactéricide
- CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice
- CMS**: Colistiméthate de Sodium
- CPE**: Entérobactéries productrices de carbapénèmases
- CPS**: Polysaccharides Capsulaires
- CS**: Colistine
- Ct**: Cycle Threshold
- CTX-M**: Céfotaximase Munich
- DAB**: Acide α - γ -diaminobutyrique
- DO**: Densité optique
- EDTA**: Ethylene diamine tetracetic acid
- FIC**: Fractionnal Inhibitory Concentration
- H2O UTP**: Eau Ultra-Pure
- H2S**: Hydrogen Sulfide
- HPLC**: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
- KPC**: Klebsiella Pneumoniae Carbapénèmase
- L-Ara4N**: 4-Amino-4-déoxy-L-Arabinose
- LPS**: Lipopolysaccharide
- MALDI-TOF-MS**: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight-Mass
- MBL**: metallo- β -lactamases.
- MCR**: mediated colistin resistance
- MH**: Mueller-Hinton

- MHLAC:** Muller Hinton liquide ajusté en cation
- MHT:** Modified Hodge Test
- Min:** Minute
- NDM:** New Delhi metallo- β -lactamase
- OMS:** Organisation Mondiale de la Santé.
- OprD :** Outer membrane protein D
- OXA:** Oxacillinases
- P.aeruginosa-RC :*** *Pseudomonas aeruginosa* résistant au carbapénème
- Pb:** Paire de bases
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PEtN:** Phospho Ethanolamine
- PMQR:** Les plasmides médiateurs de la résistance aux quinolones.
- PPD :** Prélèvement protégée distale
- PSM:** Poste de sécurité microbiologique
- Qnr:** Quinolone resistance gene
- R:** Résistant
- RT-PCR:** Polymerase Chaîne Réaction en temps réel
- S:** Sensible
- SDC:** Système à Deux Composants
- SHV:** Sulfhydryl variable
- ST:** Séquence-Type
- TBE:** Tris-Borate-EDTA
- TE:** Tris-EDTA
- TEM:** Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
- TFA:** Acide trifluoroacétique
- Tn:** transposon
- UFC:** Unité Formant Colonies
- USI:** Unité(s) de Soins Intensifs
- UV:** Ultraviolet violet
- VIM:** Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
1	Structure chimique de la colistine	17
2	Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des BGN	18
3	Régulation de la résistance à la colistine :a) <i>E. coli</i> ;b) <i>K.pneumoniae</i>	24
4	Régulation de la résistance à la colistine :a) <i>A. baumannii</i> ;b) <i>P.aeruginosa</i>	24
5	Types d'associations d'antibiotiques : méthode de cinétique de bactéricidie	37
6	Associations de deux antibiotiques par méthode E-test	38
7	Associations par méthode de bandelettes perpendiculaire	39
8	Protocole d'identification des souches isolées par (MALDI-TOF)	50
9	Test de synergie positif (production de BLSE)	53
10	Test d'Hodge modifié positif	54
11	Principe du test de synergie à l'EDTA	55
12	Détermination de la CMI par E-test	56
13	Détermination de la CMI en milieu liquide par macrodilution	59
14	Programme de la RT-PC	61
15	Programme de la PCR standard	64
16	Programme de la PCR Big Dye	66
17	Répartition des BGN-MR isolées selon l'espèce	72
18	Résistance aux antibiotiques de souches <i>E. coli</i> multirésistantes isolées	79
19	Résistance aux antibiotiques de souches <i>Klebsiella sp.</i> multirésistantes isolées	81
20	Résistance aux antibiotiques de souches <i>Enterobacter sp.</i> multirésistantes isolées	82
21	Résistance aux antibiotiques de souches <i>Citrobacter sp.</i> multirésistantes isolées	83
22	Antibiogramme de souches <i>E.coli</i> (a, c) et <i>K. pneumoniae</i> (b) multirésistantes isolées	84
23	Résistance aux antibiotiques de souches <i>A.baumannii</i> multirésistantes isolées	85
24	Résistance aux antibiotiques de souches <i>P.aeruginosa</i> multirésistantes isolées	87
25	Antibiogramme de souches <i>A.baumannii</i> multirésistantes	88
26	Antibiogramme de souches <i>P.aeruginosa</i> multirésistantes	88
27	Production de BLSE : (a) <i>E.coli</i> ; b) <i>K. pneumoniae</i>	90
28	Test d'Hodge modifié positive d'une souche <i>A.baumannii</i>	94
29	Activité synergique d'association à base de colistine sur <i>K. pneumoniae</i>	108
30	Activité synergique d'association à base de colistine sur <i>E. coli</i>	110
31	Activité synergique d'association à base de colistine sur <i>E. cloacae</i>	111
32	Activité synergique d'association à base de colistine sur <i>A.baumannii</i>	113
33	Activité synergique d'association à base de colistine sur <i>P. aeruginosa</i>	114

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
1	Type et nombre de prélèvements	47
2	Diamètre critique des zones d'inhibition pour les <i>Enterobacteriaceae</i>	51
3	Diamètre critique des zones d'inhibition pour <i>P.aeruginosa</i>	52
4	Diamètre critique des zones d'inhibition pour <i>A.baumannii</i>	52
5	Concentrations requises pour la détermination des CMI en milieu liquide	58
6	Composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR	61
7	Amorces utilisées pour la RT-PCR	62
8	Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard	63
9	Amorces utilisées pour la PCR standard	64
10	Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye	66
11	Association des sub-CMIs de la colistine avec différents antibiotiques	69
12	Répartition des BGN multirésistants selon le service	71
13	Origine des souches <i>E.coli</i> multirésistantes retenues	73
14	Origine des souches de <i>Klebsiella sp.</i> multirésistantes retenues	74
15	Origine des souches <i>Enterobacter sp.</i> multirésistantes retenues	75
16	Origine des souches <i>Citrobacter sp.</i> multirésistantes retenues	75
17	Origine des souches <i>P. aeruginosa</i> multirésistantes retenues	76
18	Origine des souches <i>A. baumannii</i> multirésistantes retenues	77
19	Caractérisation génotypique des entérobactéries productrices de BLSE	91
20	Caractérisation phénotypique et génotypique d' <i>A.baumannii</i> -RC	95
21	Caractérisation phénotypique et génotypique de <i>P.aeruginosa</i> -RC	96
22	CMI de la colistine, l'imipeneme, l'amikacine et la ciprofloxacine des <i>Enterobacteriaceae</i> testées	100
23	CMI de la colistine, l'imipeneme, l'amikacine et la ciprofloxacine des souches <i>A.baumannii</i> testées	103
24	CMI de la colistine, l'imipeneme, l'amikacine et la ciprofloxacine des souches <i>P.aeruginosa</i> testées	104
25	Type d'activité des associations sur les 35 souches <i>Enterobacteriaceae</i> testées	107
26	Type d'activité des associations sur les 21 souches <i>A.baumannii</i> -RC	115
27	Type d'activité des associations sur les 39 souches de <i>P.aeruginosa</i> -RC	116

Introduction

Introduction

L'antibiothérapie est l'une des avancées les plus importantes du vingtième siècle. Elle a permis d'entrer dans une ère d'or de prise en charge de nombreuses maladies infectieuses. L'utilisation de ces molécules a réduit de façon considérable le taux de morbidité et de mortalité lié à ce type de pathologies, ce qui montre nettement la valeur inestimable des antibiotiques pour la santé [1,2].

Cependant, l'usage massif et inadéquat de ces molécules en médecine humaine, vétérinaire et même en agriculture a engendré au fil du temps la perte de leur efficacité est en même temps a poussé les bactéries vers l'élaboration de divers moyens de résistances [3]. De nos jours, ce phénomène prend de l'ampleur et devient l'une des menaces les plus importantes pesant sur la santé publique, dont les conséquences se mesurent en termes de difficultés thérapeutiques très importantes. Cette situation concerne essentiellement les bacilles à Gram négatif (BGN) qui occupent une place prépondérante parmi les micro-organismes responsables d'infections en milieu hospitalier et communautaire [4].

Hormis, leur résistance naturelle aux antibiotiques, les BGN sont connus par leur remarquable aptitude de développer et d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance [5]. D'où l'augmentation actuelle de l'incidence des BGN dans les infections causées par les bactéries multirésistantes (BMR). Certains auteurs, rapportent qu'aux Etats Unis d'Amérique plus de 2 millions de personnes sont infectées chaque année par les BMR avec 23 000 décès [6]. La situation n'est pas meilleure en Europe où l'on compte plus de 12 500 décès due aux BMR chaque année [7]. Les professionnels de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) prédisent qu'en l'an 2050, aux Etats-Unis la mortalité due à l'antibio-résistance atteindrait les dix millions par an, et deviendra la première cause de décès. Cette vilaine évolution menace de nous ramener à l'ère pré-antibiotique [8].

La situation est d'autant plus grave lorsqu'on note aussi que le nombre de nouveaux antibiotiques en cours de développement est très réduit. En effet, un seul nouvel antibiotique (la teixobactine) a été découvert au cours des 30 dernières années [9], comparé au nombre d'antibiotiques découverts dans les années 40 à 60. L'une des solutions qu'on préconise pour la résolution de ce problème est la réintroduction et la

requalification d'anciennes molécules délaissées pour des raisons non toujours établies. Ceci concerne le traitement des infections causées par des bacilles à Gram négatif multirésistants [10]. Parmi ces molécules attirant l'attention des professionnels de la santé la colistine.

Il s'agit d'un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines, découvert au Japon en 1949 chez *Bacillus polymyxa subspecies colistinus*. Il est bactéricide, agissant sur la membrane cytoplasmique. Qui en se liant au fragment du lipide A du lipopolysaccharide des BGN conduit à la rupture de la membrane cytoplasmique avec fuite cellulaire. Peu de temps après sa découverte, la colistine en médecine humaine est abandonnée en raison de sa toxicité supposée [11].

Durant les années 90 l'émergence sans précédent des bacilles multirésistants à conduit à un regain d'intérêt pour la colistine précédemment réservée aux patients atteint de mucoviscidose récalcitrante [12]. Mais aussi utilisée dans le traitement des infections graves à bacilles à Gram négatif multirésistants tel que les entérobactéries et les non-fermentant producteurs de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), de carbapénèmases, de méthylases ou de gyrases [4].

Cependant, le retour à ce type de molécule s'est accompagné d'une augmentation non négligeable de la fréquence d'isolement de souches résistantes à la colistine. Ainsi, ces dernières années plusieurs études décrivent des résistances acquises à la colistine à médiation plasmidique codées par le gène *mcr* et ses variants chez différentes espèces de BGN à travers le monde [13]. Ce qui menace l'apparition d'épidémies de résistance vue la transmission horizontale et l'élargissement du spectre de genres concernés. Parallèlement, on signale une dissémination croissante des infections causées par des bactéries naturellement résistantes à la colistine telle que *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Morganella sp.* et *Serratia sp.* [14,15]. Cette mauvaise évolution menaçant de nous conduire progressivement à "l'ère des infections bactériennes incurables " en raison de la résistance aux antibiotiques de dernier recours [16,17].

Tous s'accordent qu'un des moyens de prévention et de lutte contre l'apparition de résistance est l'utilisation en thérapeutique d'associations d'antibiotiques. En effet, pour la prévention de la résistance dans le cas de la tuberculose on utilise l'association de la rifampicine avec l'ofloxacine [18]. Actuellement, en raison de la rapidité de

sélection de mutants résistants on recommande l'utilisation de trois molécules (isoniazide, rifampicine et pyrazinamide) en association comme traitement de choix de la tuberculose et pendant une durée de six mois [19].

En connaît aussi plusieurs catégories d'association. Parmi elles, celles faites de molécules ayant la même cible, ou de cibles différentes [20]. Ainsi, Mikhail *et al.* proposent l'association ceftazidime/avibactam avec méropénème pour la prise en charge d'infection à *P. aeruginosa* multirésistants [21]. On propose sur un autre plan l'usage de l'association ampicilline/gentamicine pour la prise en charge des endocardites à cocci à Gram positif ou à bacilles à Gram négatif multirésistants [22].

Plusieurs études, qualifient une bonne synergie et bactéricidie avec un faible antagonisme et un développement moindre de la résistance vis-à-vis de l'association de la colistine avec les carbapénèmes [23], les aminosides et les quinolones [24,25].

En prévention de la toxicité de la colistine d'une part et de l'apparition de résistance des BGN-MR isolés de différents services hospitaliers (CHU-Annaba) vis-à-vis de cet antibiotique le présent travail se propose de :

- Collecter des BGN-MR rendus responsable d'infections chez des patients du CHU-Annaba-Algérie.
- Caractériser des associations d'antibiotiques d'usage routinier en milieu hospitalier à base de colistine à des concentrations sub-inhibitrices.
- Qualifier le type d'activité de l'association de la colistine avec les β -lactamines (l'imipénème), aminosides (amikacine) et quinolones (ciprofloxacine).

Partie I

Analyse bibliographique

Chapitre I. Bacilles à Gram négatif multirésistants

1. Généralités

Les BGN occupent une place prépondérante parmi les protistes Procaryotes. En effet, par leur spectre d'enzymes de dégradation, ils prennent part dans le cycle de la matière, par la réinsertion des macromolécules et peuvent être à l'origine de diverses synthèses. Ce sont d'excellents agents de dépollution ou de contamination de divers écosystèmes (l'eau, l'air, aliments, etc...). D'autre part ils sont aussi responsables de diverses pathologies chez les végétaux, les animaux et chez l'homme.

Il s'agit d'un très vaste groupe de bactéries en forme de bâtonnet plus ou moins allongés droits ou légèrement incurvés à extrémité pointue ou arrondie. Isolés, disposés par paire ou en chaînettes et regroupés dans divers types taxonomiques (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* et autres). En fonction du type respiratoire il se subdivise en quatre sous groupes : aéro-anaérobies, aérobies stricts, microaérophiles et les anaérobies stricts.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons particulièrement aux aéro-anaérobies facultatifs et aux aérobies stricts.

En dehors de la résistance naturelle de plusieurs espèces du groupe des bacilles à Gram négatif, on assiste durant ces trente dernières années à l'apparition et la dissémination mondiale de résistances acquises à de nombreux antibiotiques. Dans plusieurs cas cette résistance est de type multiple voire total. C'est devenu alors un problème majeur de santé publique à côté d'un manque de nouvelles molécules chimiothérapeutiques.

2. Bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs

La majeure partie des BGN est occupée par les genres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries ayant une forte analogie. La découverte de cette famille s'est faite en 1937 par Rahn qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* [26]. Ils sont très hétérogènes sur le plan pathogénie et écologie ; en effet ils sont retrouvés soit à l'état saprophytes, commensal ou encore parasite.

Les espèces qui composent cette famille ont généralement une taille comprise entre 2 et 4 µm de long sur 0,4 et 0,6 µm de large, mobiles grâce à une ciliature polaire ou immobiles, non sporulés. Dépourvue d'oxydase, catalase positif, réduisant les nitrates en nitrites, utilisant le glucose par métabolisme fermentatif avec ou sans production de gaz. Certaines espèces peuvent être entourées par une capsule qui leur confère la virulence comme *Klebsiella pneumoniae*. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion [27].

Les entérobactéries sont des bactéries non exigeantes poussant facilement sur des milieux ordinaires en aérobiose et en anaérobiose. La température optimale de culture varie selon l'espèce. Le temps de division est de 20 à 40mn. Ce sont des microorganismes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5.5 - 8) et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique [28].

Ce sont des bactéries ubiquitaire retrouvée dans le sol, l'eau, au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles constituent en effet une part prépondérante du microbiote intestinale de l'homme et sont relativement rencontrées dans d'autres sites du corps tel que la cavité bucco-dentaire, les vois aériennes supérieures et sur les organes génitaux [29].

Les entérobactéries possèdent trois types d'antigènes (O, H, K). L'antigène O est le seul constamment exprimé par toutes les bactéries de ce groupe mais de structure différente d'une souche à une autre [27].

➤ **Antigène O** (somatique)

C'est un élément de la paroi bactérienne. Il est porté par le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe, thermostable et très toxique constituant l'endotoxine. L'agglutination des bactéries par l'antisérum O de spécificité correspondante est lente et granulaire. Il permet la synthèse d'immuns sérums ayant un intérêt diagnostique clinique et épidémiologique [27].

➤ **Antigènes H** (flagellaire)

Il est de nature protéique, présent uniquement chez les entérobactéries mobiles, non toxique, thermolabile, permet une identification antigénique de certaines espèces (*Salmonella sp*, *Escherichia coli* ...). Les réactions d'agglutination où ils interviennent

se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation [27].

➤ **Antigène K** (capsulaire)

C'est un antigène de l'enveloppe, de nature polysidique, soluble et thermolabile utilisés dans le diagnostic au laboratoire par des techniques d'agglutinations souvent simples et rapides [27].

En effet, ces dernières années la résistance des entérobactéries aux β -lactamines notamment aux carbapénèmes connaît une grande évolution et propagation dans le monde entier. Ceci par la production d'enzymes telle que : les céphalosporinases plasmidique, les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases. Les gènes codant pour ces enzymes sont généralement situés sur des plasmides transférables souvent associés à d'autres gènes de résistance aux autres classes d'antibiotiques [4].

La résistance aux aminosides et aux quinolones est marquée par l'émergence et la dissémination des nouveaux déterminants de résistance tel les méthylases de l'ARN 16S [16S-RMTase] comme ArmA, RmtB et RmtC et les déterminants de résistance plasmidique aux quinolones (plasmid-mediated quinolones resistance [PMQR]) comme les gènes *qnr* ou encore l'enzyme bi-fonctionnelle AAC [6']-1b-cr [4].

De telles souches sont souvent à l'origine d'infections potentiellement sévères aussi bien en milieu hospitalier que communautaire et chez les animaux.

- ***Klebsiella pneumoniae* multirésistants**

K. pneumoniae est un habitant naturel du microbiome du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux en bonne santé. Il s'agit d'un agent pathogène opportuniste important qui provoque fréquemment des pneumonies communautaires et nosocomiales avec un taux de mortalité peut atteindre les 50%. Elle est également responsable de 9% des infections de tractus urinaire, ainsi les infections des plaies chirurgicales, les endocardites et la septicémie [30]. Actuellement, une propagation rapide des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes notamment celle productrices de BLSE et de carbapénémases dans différents régions de monde.

Une étude réalisée en 2019 par Xu *et al.* montrent une prévalence très importante des souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénèmases de type KPC-2 rendues responsables de méningites en Chine [31]. Ferreira *et al.* ont rapportent aussi une prévalence très élevée de 84% des souches de *K. pneumoniae* coproductrices de BLSE et de carbapénèmases type KPC et OXA-1 isolés à partir des patients hospitalisées au niveau de l'unité de soins intensifs (USI) d'un hôpital au nord du Brésil [32]. Mezzatesta *et al.* en 2014 identifiée la présence de deux clones *K. pneumoniae* ST147 et ST395 produisant l'enzyme KPC-3, au Pays-Bas et au Canada, respectivement [33].

Récemment, entre 2013 et 2015 un clone épidémique de *K.pneumoniae* ST231 est apparu en Asie du Sud-Est qui exprime la coproduction d'une carbapénèmase type OXA-232 et de BLSE type CTX-M-15. La résistance aux aminosides c'est fait par la méthyltransférase de l'ARNr 16S RmtF [34].

En Tunisie, Ktari *et al.* en 2010 mettent en évidence la dissémination des souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase OXA-48 [35]. Puis, en 2013 Nasr *et al.* décrivent l'émergence de souches de *K. pneumoniae* qui exprime une coproduction de deux type carbapénémase de NDM-1 et OXA-48 [36].

Au Maroc, plusieurs études décrivent l'émergence et la propagation de souches de *K.pneumoniae* productrices de carbapénèmases NDM-1 et OXA-48 [37]. Ensuite, en 2013 rapportent la première souche de *K. pneumoniae* qui à exprimé la coproduction de trois gènes qui codent pour des carbapénémases : NDM-1, VIM-1 et OXA-48 [38].

En Algérie, la prévalence des souches de *K.pneumoniae* productrice de carbapénèmases isolés des échantillons humaines atteignant 61.3%. Alors que dans les échantillons non humains cette prévalence est de 51.1%. Les principaux carbapénèmases décrits chez cette espèce sont : VIM-19, NDM-1, KPC2, KPC-3 et OXA-48 qui sont les plus répandues [39].

Concernant la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones, les taux de résistance sont globalement très élevés [37].

- ***Escherichia coli* multirésistants**

E. coli est la bactérie commensale la plus fréquente du tractus gastro-intestinal chez l'homme et l'animal. Elle est également responsable de nombreuses infections : intra-abdominales, urinaire, bactériémies, méningites (survenant le plus souvent chez le nouveau-né), pneumonies et autre [40].

Au fil des ans, *E. coli* est devenu de plus en plus résistante aux antibiotiques. La production de BLSE notamment de type CTX-M est l'un des principaux mécanismes conférant une résistance aux céphalosporines [41].

Récemment, des carbapénèmases de classe A, B et D sont décrites chez des souches d'*E. coli* dans le monde entier. En France, une enquête épidémiologique entre 2012 et 2013 sur des souches *E. coli* productrices de carbapénèmases reçus au centre national de référence révèle la présence de 140 isolats d'*E. coli* productrices de carbapénèmases, dont 74% de type OXA-48 et 21% de type NDM [42].

En Espagne, Ortega *et al.* en 2016 montrent une prévalence très importantes de 50.6% des souches *E. coli* productrices de carbapénèmases, dont 71.9% sont des OXA-48, 22.3% sont des VIM-1, 3.3% sont des KPC-2, 1.7% sont des NDM-1 et 0.8% sont des IMP-22 [43].

En Libye, Abujnah *et al.* en 2015 s'intéressent à la prévalence de souches *E. coli* multirésistantes et identifient 69 isolats parmi 373 *Enterobacteriaceae*. Treize des 69 souches *E. coli* sont coproductrices de BLSE et d'oxacillinases [44].

En Algérie, *E. coli* est la deuxième entérobactérie productrice de carbapénèmases après *K. pneumoniae* avec une prévalence de 23.6% dans les infections humaines. Concernant les infections non humaines cette prévalence est de 17.1%. Les carbapénèmases OXA-48, OXA-44 et NDM-1 sont les plus fréquemment détectées [39].

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, le taux de résistance est aussi très élevé. En effet, Agabou *et al.* montrent un taux de résistance à la ciprofloxacine de 74.5% chez des souches *E. coli* productrices de BLSE. Le gène *aac(6')-Ib-cr* est détecté dans 72.9% souches *E. coli* résistantes à la ciprofloxacine, les gènes *qnrS* et *qnrB* dans 10% ,7.1% des souches respectivement [45].

- ***Enterobacter sp. multirésistants***

Enterobacter est un membre du groupe ESKAPE qui contient les principaux agents pathogènes bactériens résistants. Le genre *Enterobacter* est identifié pour la première fois en 1960, actuellement vingt-deux espèces appartiennent à ce genre. Ces espèces sont décrites dans l'environnement et ont été signalées comme des agents pathogènes opportunistes chez l'homme, les animaux et les végétaux [46].

E.cloacae et *E. aerogenes*, représentent les espèces les plus fréquemment isolées dans les infections hospitalières, en raison de l'adaptation de ces bactéries aux agents antimicrobiens et de leur comportement en tant que pathogènes opportunistes [46].

Chez ces espèces, le mécanisme de résistance aux céphalosporines le plus important est la surproduction chromosomique de β -lactamases AmpC. Ces enzymes sont inductibles et peuvent être exprimées à des niveaux élevés de résistance par mutation qui peuvent facilement être sélectionnés pendant la thérapie et peuvent se propager dans l'environnement hospitalier [47]. D'autres mécanismes de résistance au β -lactamine ont été décrits chez *Enterobacter sp.* tels que la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), la diminution de la perméabilité membranaire qui due à un manque de porine combiné à une production de β -lactamase constitutive de haut niveau conduisant à la résistance à l'imipénème [47].

Une étude effectuée par Nedjai *et al.* en 2013 révèlent que la prévalence des souches *E.cloacae* productrices de BLSE dans les hôpitaux d'Annaba est de 47.6%. En Corée cette prévalence est de 35.4%. Tandis qu'elle dépasse 43% dans les pays comme Singapour, Philippines et la Chine continentale [48].

Les carbapénémases décrites chez *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes* incluent : KPC, IMP, les métallo- β -lactamases (dont VIM et NDM-1) et les enzymes type OXA notamment OXA-48 qui est la plus répandue en Algérie. Les infections dues à *Enterobacter sp.* résistant aux carbapénèmes sont associées à une mortalité élevée [37].

En 2013, une étude épidémiologique sur *E. cloacae* a indiqué que les gènes codant pour les enzymes modifiant les aminoglycosides les plus répandus sont le *aac(3)-IIa*, le *aac(6)-Ib*, et *ant(2'')-Ia*, qui confèrent la résistance à la tobramycine, la

gentamicine et l'amikacine. Ces enzymes sont associées à d'autres gènes d'origine plasmidique telle que l'*armA* chez 77% des souches [37].

- ***Citrobacter sp. multirésistants***

Le genre *Citrobacter* est découvert en 1932 par Werkman et Gillen. Avant 1993, seule trois espèces *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* (*Citrobacter diversus*) et *Citrobacter amalonaticus* ont été identifiés. *C. freundii* est l'espèce type de ce genre, et les deux dernières espèces ont été appelées d'autres noms. *C. koseri* a été accepté pour remplacer le nom *C. diversus* par la Commission judiciaire du Comité international de bactériologie systématique en 1993. La même année, Brenner *et al.* à classé *Citrobacter* en 11 espèces selon l'hybridation d'ADN: *C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii*, *C. rodentium*, *C. gillanii* et *C. murliniae* [49].

Ce sont des agents pathogènes opportunistes responsables de diverses infections telles que des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux, des abcès cérébraux, des pneumonies et d'autres infections néonatales comme la méningite, le sepsis néonatal en particulier chez les nouveau-nés et les hôtes immunodéprimés [50].

Ces espèces sont généralement sensibles à de nombreux antibiotiques y compris les céphalosporines de troisièmes générations, les carbapénèmes, les aminosides, les quinolones. Cependant, des souches *Citrobacter sp.* multirésistantes ont été signalés dans le monde entier en raison de l'acquisition des enzymes notamment de carbapénèmases qui lui confèrent cette multirésistance [50].

En effet, La prévalence mondiale des souches *Citrobacter sp.* productrices de BLSE est de 0.5 à 36% [51]. De plus, la prévalence des gènes de résistance aux quinolones *qnr* et *aac (6')-Ibcr* en chine et de 72,8% et 68,9%, respectivement [51]. L'étude de Liu *et al.* révèlent que la majorité (61,3%) des souches de *Citrobacter sp.* collectées présentant un profil de multirésistance. Notant que ces souches sont isolées de patients souffrant de diarrhée et d'aliments. Ce qui explique que la nourriture peut être une source importante de transmission de cette espèce à l'homme [51].

- ***Salmonella sp. multirésistants***

Salmonella est l'une des causes principale des infections d'origine alimentaire dans le monde. Une étude a estimé que les salmonelles sont responsables de 93.8 millions de cas humains de gastroentérites dont 90 % seraient d'origine alimentaire et 155 000 morts dans le monde chaque année [52]. Jusqu'à présent, plus de 2 600 sérotype ont été identifiés dans le monde [53]. Les deux principaux sérotype responsable d'infection chez l'homme ces dernières années sont respectivement *Enteritidis* et *Typhimurium* [52].

Cette bactérie est naturellement sensible à de nombreux antibiotiques considéré comme des alternatives pour le traitement des salmonelloses sévères telle que : céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération, ciprofloxacine, l'azithromycine et les carbapénèmes. Aujourd'hui, la situation est changée avec une évolution rapide et inquiétante des souches multirésistantes [54].

Les mécanismes de résistance le plus répandue chez *Salmonella* aux β -lactamines notamment aux C3G/4G, sont la production de BLSE et de céphalosporinases (codées par les gènes plasmidiques AmpC et CMY-2) [11].

Deux études menées au Portugal en 2012 et 2014 mettent en évidence une augmentation du taux de résistance aux C3G de 0,45% à 1,9% chez des souches de *Salmonella* isolées chez des porcs, des volailles, de l'alimentation animale et des produits alimentaires d'origine animale [11]. De plus, la proportion de souches *Salmonella* multirésistantes (c'est-à-dire résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques) s'élève à 20%. Cependant, le taux de multirésistance des souches *Salmonella* humaines (résistantes à minima aux C3G et aux fluoroquinolones) reste relativement plus faible et varie de 5,4 à 8% [11].

3. Bacilles à Gram négatif aérobies stricts

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGN-NF) sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation [3].

Ce sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales [55].

Le groupe de BGN-NF comporte plusieurs genres y compris *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Flavimonas*, *Frateuria*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Bordetella*, *Kingella*, *Oligella*, *Protomonas*, *Xanthomonas* [3].

Au sein de ce groupe, les espèces les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia* [3].

- ***Acinetobacter baumannii* multirésistants**

Le genre *Acinetobacter* comprend 34 espèces et *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier. Il est actuellement défini comme appartenant à la famille des *Moraxellaceae* [3].

Ce sont des coccobacilles souvent associés par deux, immobile (mais pouvant se déplacer grâce à des structures polaires ressemblant à des fimbriae de 5 nm de diamètre et de 10 à 15 nm de long), aérobies stricts, oxydase négative et catalase positive. Ils ne fermentant pas le glucose, possèdent un nitrate réductase mais ne les réduisent pas en milieu complexe [3].

C'est une bactérie commensale chez l'homme saine qui peut être retrouvée de façon transitoire à faible densité sur les zones de la peau chaude et humide, comme le montre des études sur des patients non hospitalisés qui ont retrouvé des taux

d'isolement au niveau de la peau variant de 0.5% à 3% et dans les selles humaines avec 0.8% [56].

A.baumannii est une bactérie qui occupe actuellement une place très importante en pathologie hospitalière à l'échelle mondiale. Il est estimé être la cause de 2% à 10% de toutes les infections à Gram négatif dans les unités de soins intensifs aux Etats-Unis et en Europe avec un taux de mortalité allant de 26.5 % à 91% surtout chez les patients immunodéprimés. Les infections associées à cette bactérie sont les infections pulmonaires, les infections du site opératoire, les infections septicémiques à point de départ des cathéters, les infections urinaires et du système nerveux central [57].

A.baumannii est naturellement résistant à plusieurs antibiotiques tel que la pénicilline G, l'amoxicilline, les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations, l'Aztréonam, l'Ertapénème, la Fosfomycine, la Triméthoprimé et aux furanes. Il possède aussi sur son chromosome un gène de résistance naturelle code pour une oxacillinase type OXA-51[58].

Cette résistance naturelle résulte de l'association de plusieurs mécanismes incluant la taille réduite des protéines de membrane externe et une production limitée de porines ce qui entraînant une diminution de la perméabilité membranaire et donc une augmentation de la résistance aux antibiotiques. De plus à sa résistance naturelle *A.baumannii* possède aussi une capacité d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance. Ce qui rend cette bactérie multirésistantes [55].

Ces dernières années l'émergence et la propagation des souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes est signalée dans le monde entier. Cette situation est devenue un problème important de la santé publique, car ces antibiotiques constituant le traitement de choix contre les infections dues à cette bactérie multirésistantes [59].

La résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est le plus souvent médiée par la présence de trois types de carbapénémases: les β -lactamases de classe A notamment KPC-2 et GES-14; les β -lactamases de classe B (les métallob β -lactamases) principalement NDM-1, IMP-1, VIM-2, SIM-1; les β -lactamases de classe D (les oxacillinases) en particulier OXA-23, OXA-24 et OXA-58 [59].

Selon des études de surveillance multicentrique, la proportion des souches *A. baumannii* résistantes à l'imipénème est de 85% dans les USI en Grèce (taux de

résistance le plus élevé d'Europe selon l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System) et de 48% chez les patients hospitalisés en Espagne et en Turquie [11].

Une étude réalisée par Touati *et al.* en 2012 montrent que parmi les 30 souches *A. baumannii* isolées au niveau de service de réanimation CHU- Annaba. 24 d'entre elles sont résistantes aux carbapénèmes, dont 22 hébergent le gène *bla*_{OXA-23}, une souche possède le gène *bla*_{OXA-58} et une autre souche possède les deux gènes au même temps. De plus, 13 souches possèdent le gène TEM-128. La résistance aux autres antibiotiques est aussi très élevée elle est de 71.6% et 100% vis-à-vis des aminosides et des fluoroquinolones respectivement [60].

Une autre étude effectuée en 2014 dans trois hôpitaux Algériens (Alger, Setif et Bejaia) par Bakour *et al.* sur 47 souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes révèlent la présence de gène *bla*_{OXA-23} dans 33 souches et le gène *bla*_{OXA-24} dans 10 souches. Alors que le gène *bla*_{NDM-1} est détecté dans 11 souches. Ainsi ces souches montre un taux de résistance très élevé aux aminosides qui dû à la méthylation de l'ARNr 16S par la protéine codée par le gene *armA*. La résistance aux fluoroquinolones est apparue dans toutes les souches suite à des mutations au niveau de gène *gyrA* et *parC* [61].

Au Maroc, Zohoun *et al.* en 2013 montrent une prévalence très élevés de 75.6% des souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes dont 40% sont productrices de métallo- β -lactamases [62].

De même Hammami *et al.* en 2011 rapportent l'émergence et la désamination de souches d'*A.baumannii* résistantes aux carbapénèmes par production de carbapénémase type OXA-23 dans 82% des souches isolées [63].

- ***Pseudomonas aeruginosa* multirésistants**

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet droits et fins avec une taille comprise entre 0.5 et 1.3µm de long sur 0.5 et 0.8 µm de large, représentant de manière isolée ou groupée par deux. Mobile grâce à une ciliature polaire, dépourvu de spores et de capsules, oxydase positif. Leur membrane externe contient des porines dont le nombre et la taille, susceptibles de varier, conditionnent la perméabilité aux antibiotiques. La structure du LPS (lipopolysaccharide) de cette membrane est également très hétérogène [64].

Elle est autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique, produisant le plus souvent de la pyoverdine et de la pyocyanine est pouvant également excréter de la pyomélanine (pigment brun noir) et de la pyorubrine (pigment rouge). Elle est caractérisée par une odeur aromatique caractéristique (seringat) [64].

C'est une bactérie mésophile capable de se développer dans des températures allant de 4°C à 45°C avec une température optimale de croissance entre 30 et 37°C. Elle possède aussi un métabolisme oxydatif, mais en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons [65].

P. aeruginosa est l'espèce bactérienne dont l'habitat est le plus vaste. Elle vit à l'état saprophyte dans des environnements humide, ou à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elle peut être aussi vivre et se multiplier sur des supports inertes humides voire des solutions antiseptiques conservées trop long temps [55].

P. aeruginosa renferme de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction. La majorité des souches de *P.aeruginosa* 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 multirésistantes aux antibiotiques [55].

P.aeruginosa est responsable d'environ 10% à 20% des infections nosocomiales comme la bactériémie, la septicémie, la fibrose kystique, la pneumonie, les infections des voies urinaires, les brûlures et les plaies en USI. Le traitement de ces infections est

souvent difficile en raison de la résistance naturelle et acquise de cette bactérie à plusieurs antibiotiques [66].

La prévalence de la résistance aux anti-pseudomonas (appartenant principalement aux familles des β -lactamines, des aminosides, des fluoroquinolones et des carbapénèmes) est en augmentation ces dernières années en particulier pour les antibiotiques β -lactamines. En effet, des épidémies à *P. aeruginosa* résistant à tous ces antibiotiques ont été rapportées ces dernières années surtout chez des patients atteints de mucoviscidose, ainsi que dans les unités des grands brûlés et les centres de cancérologie [11].

Les principale carbapénémases décrites chez *P.aeruginosa* sont les métallo- β -lactamases (MBL) et sont responsables avec la modification de la porine OprD par mutation génétique, de la résistance aux carbapénèmes chez cette bactérie [11]. De plus, des mutations ponctuelles sur les gènes *gyrA / gyrB* et *parC/parE* induisent une résistance aux fluoroquinolones [67].

Les données publiées par le National Nosocomial Infection Surveillance System américain rapportent des taux de la résistance à l'imipénème et aux quinolones chez *P. aeruginosa* s'élevant respectivement à 21,1% et 29,5%. Pour les isolats identifiés dans les USI, les taux de résistance sont souvent plus élevés (jusqu'à 51.6% pour la ciprofloxacine, 38% pour l'imipénème) [11]. Touati *et al.* en 2013 montrent aussi que 50% des souches de *P. aeruginosa* isolées sont résistantes aux carbapénèmes. De plus, 56.6% des ces souches sont résistantes aux fluoroquinolones [55].

Une étude basée sur le clone SP/ST277 brésilien *P. aeruginosa* sensible uniquement à la colistine (porteur du gène *bla_{SPM-1}*) met en évidence son potentiel épidémique voire pandémique via sa propagation du Brésil en Europe [11].

Une étude menée par Preze *et al.* en 2020 dans douze hôpitaux différents (en Espagne, en Italie et en Grèce) sur 59 souches de *P. aeruginosa* montre que la prévalence des souches multirésistantes et de 88,9% [68].

- *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia a été isolé pour la première fois en 1943 sous le nom de *Bacterium bookeri*, puis nommé *Pseudomonas maltophilia* en raison de sa ciliature polaire et de l'acidification du maltose. En 1983 ce microorganisme est dénommé *Xanthomonas maltophilia*, cependant on constate que les différences avec les *Xanthomonas* sont plus importantes que les similitudes d'où la création d'un nouveau genre *Stenotrophomonas* en 1993, comprenant *Stenotrophomonas maltophilia* comme seule espèce [69].

Stenotrophomonas maltophilia est un bacille aérobie strict, assez fin, de longueur moyenne (0.5 à 0.8 µm sur 1.5 à 3 µm) mobile avec quelque flagelle polaire. Il est ubiquitaire et saprophyte de l'environnement, mais également colonise l'homme surtout au niveau de nez, de la gorge et du tube digestif [70].

Il s'agit d'un agent pathogène opportuniste responsable d'infection multiple : infection des voies respiratoires, bactériémie, septicémie, infections des os et des articulations, infection des voies urinaires et des tissus mous, infections oculaires, endocardite et la méningite [71]. *S. maltophilia* est un pathogène important chez les patients immunodéprimés et cancéreux, en particulier ceux atteints d'un cancer obstructif du poumon [71].

Cette bactérie montre une résistance naturelle à plupart des familles d'antibiotiques y compris les β-lactamines, les fluoroquinolones, les aminosides, les tétracyclines, les polymyxines et le chloramphénicol. Cette résistance est due essentiellement à la faible perméabilité membranaire et la présence de pompes à efflux codées chromosomiquement [71].

Le triméthoprime /sulfaméthoxazole est l'antibiotique de choix contre les infections grave à *S. maltophilia*. Cependant au cours des dernières années des souches résistantes est apparue vis-à-vis de cet antibiotique [72].

- ***Burkholderia cepacia***

Il est décrit pour la première fois en 1950 par Burkholder sous la dénomination de *Pseudomonas cepacia* comme une bactérie phytopatogène (oignon, riz).

Il s'agit un bacille assez fin, mobile grâce une ciliature polaire multitrèche, cultivant à une température optimale de 30°C à 35°C et capable d'assimiler un grand nombre de substrats. Il produit peu de facteurs de virulence comme l'hémolysine, les protéases, l'exopolysaccharides, les lipases et les sidérophores par rapport à *P.aeruginosa* [72].

Cette bactéries occupe diverses niches écologiques (sols, l'eau, animaux, les plantes et les humains), est peuvent être aussi survie dans l'environnement hospitalier.

Il est opportuniste fréquemment retrouvé comme agent colonisant ou infectant les voie respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Il résiste à de nombreux antibiotiques et désinfectants tel que polyvidone iodée et chlorhexidine [73].

Les infections dues à ces bactéries multirésistants sont difficiles à traiter du fait des options thérapeutiques limitées et mènent à une réintroduction de la colistine en tant que « antibiotique de dernier recours ».

Chapitre II. La colistine

1. Historique

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines. Au sein de cette famille, on retrouve 5 groupes chimiquement différents (polymyxine A, B, C, D, E). Cependant seules les polymyxines B et E sont utilisées en médecine humaine et/ou vétérinaire [74]. Cette famille est découverte en 1947 avec la polymyxine B qui est produite par *Bacillus polymyxa*. Cette dernière est souvent retrouvée en médecine humaine dans les onguents antibiotiques à usage topique ou dans les gouttes pour les yeux [75].

La polymyxine E (colistine) est synthétisée en 1949 au Japon par Kayoma *et al.* à partir d'une culture d'un bacille mésophile sporulé isolé du sol (*Bacillus polymyxa subspecies colistinus*). Elle est utilisée pour la première fois au Japon et en Europe dans les années 1950 puis aux États-Unis en 1959 [11]. Après une large utilisation dans les années 1960, la colistine est abandonnée sur le marché thérapeutique dans les années 1970 en raison de son éventuelle néphrotoxicité et neurotoxicité. Elle est ensuite remplacée par d'autres antimicrobiens considérés soit disant moins toxiques telles que les aminoglycosides. À partir des années 1980-1990 la colistine connaît un regain d'intérêt avec une utilisation croissante dans le traitement des infections graves à bacilles à Gram négatif multirésistants [12].

2. Formes pharmaceutiques et indications

On connaît deux formes pharmaceutiques commercialisées pour la colistine :

- Le sulfate de colistine : commercialisé sous forme de comprimés.
- Le colistiméthate sodique (CMS) : distribué sous forme de poudre à reconstituer avec du sérum physiologique pour administration par voie intraveineuse ou aérosol. C'est la formulation disponible dans le commerce, du fait de sa toxicité moindre [76].

Deux formulations de CMS sont disponibles commercialement en médecine humaine :

- La Colomycin Injection® fabriquée et utilisée en Europe, et s'exprime en unités internationales (500000 UI, 1 ou 2 MUI par flacon).
- La ColyMycin M Parenteral® fabriquée et utilisée aux États-Unis, et conditionnée en flacon contenant 150 mg de CBA (Colistin Base Activity) [77].

Les doses habituelles chez l'adulte pour le colistiméthate sodique sont de 75 000 à 150 000 UI par kg et par jour, sans dépasser 12 000 000 UI par jour, habituellement réparties en 1 à 3 administrations journalières. Cependant, chez les nourrissons, nouveau-né et les prématurés est de 150 000 à 225 000 UI /kg/j sans dépasser 12 000 000 UI par jour. Cette posologie est à adapter en fonction de l'état de la fonction rénale du patient [13, 78].

3. Structure chimique

La colistine est un polypeptide cationique constitué par :

- un cycle de 7 acides aminés formé de quatre molécules d'acide α - γ -diaminobutyrique (DAB), deux molécules de D-leucine et d'une molécule de thréonine.
- Une chaîne latérale linéaire formée de molécules d'acide α - γ -diaminobutyrique liées entre elles, d'une molécule de thréonine et portant sur la fonction amine libre du dernier acide DAB un acide gras saturé (Figure1) [11].

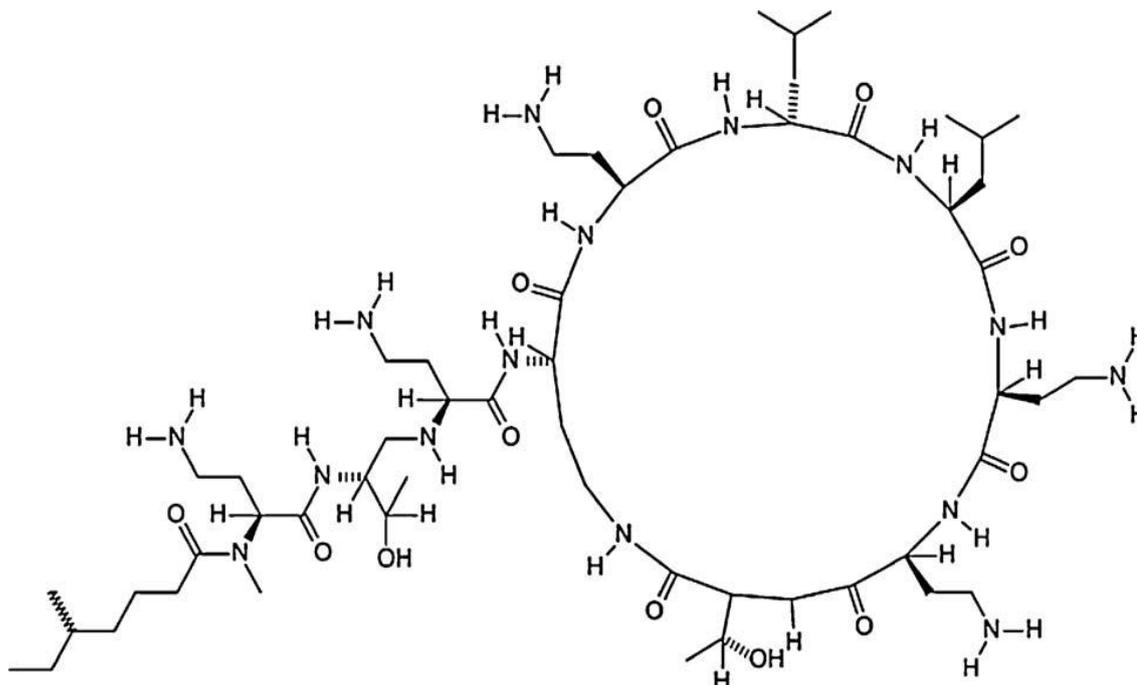


Figure 1 : Structure chimique de la colistine [12]

La colistine est caractérisée par une structure amphiphile, c'est-à-dire qu'elle possède une région hydrophile (la partie cyclique) et une région hydrophobe (la chaîne d'acide gras). Cette caractéristique qui les rapproche d'une molécule de

détergent est permettre à la colistine d'interagir avec les membranes cellulaires et de modifier leurs perméabilités [79].

4. Mécanisme d'action

La colistine est un antibiotique bactéricide agissent sur la membrane externe de bacille à Gram négative et plus précisément sur les lipopolysaccharides (LPS). Cette dernière, constituée de trois parties : le lipide A situé dans la membrane externe de la bactérie, une partie centrale (central core) oligosaccharidique et par une chaîne polysaccharidique formant l'antigène O. Le lipide A joue un rôle important dans le mode d'action de la colistine. En effet, la colistine chargé positivement (groupement NH_2) vient se lier avec les chaînes d'acides gras du lipide A chargé négativement (groupement phosphate), puisque la colistine possède une affinité pour le LPS trois fois supérieure à celle des cations divalents magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}) qui sont normalement présents dans la membrane externe et qui assurent ainsi la stabilité de celle-ci. Cette interaction provoque le déplacement des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} est engendrant ainsi une perturbation dans la fonction de la membrane externe. Il y aura par la suite, formation de pores qui permettront aux contenus intracellulaires de s'échapper dans l'espace extracellulaire provoquant ainsi une libération d'enzymes lytiques aboutissant à la lyse cellulaire (mort de la bactérie) (Figure 2) [80].

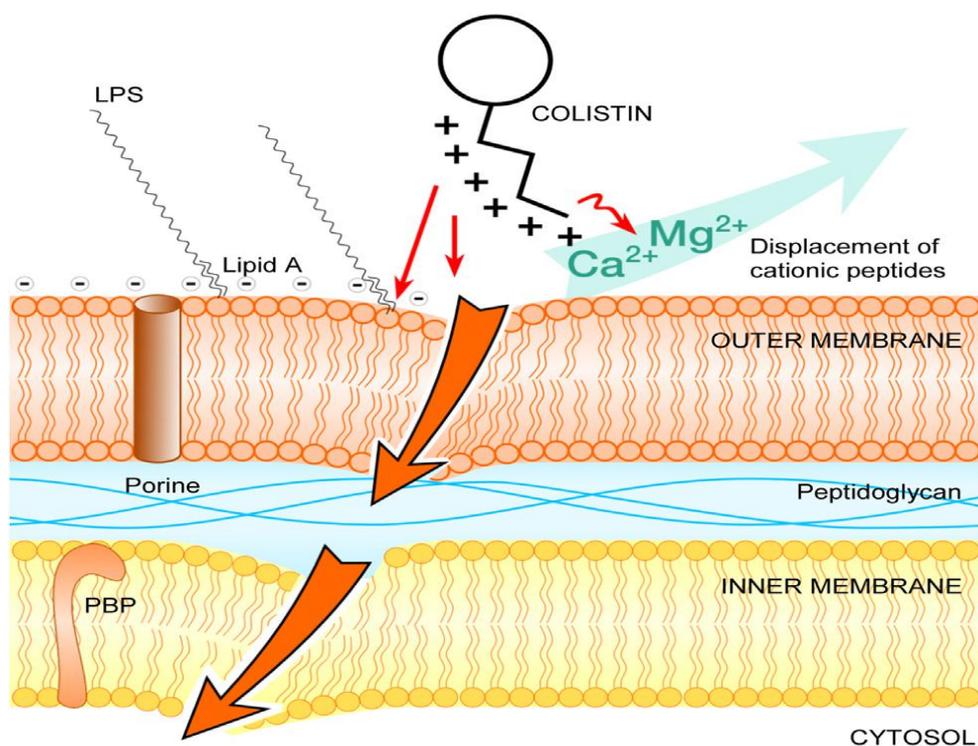


Figure 2 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des BGN [81].

De plus, la colistine possède aussi un effet anti-endotoxine. L'endotoxine des bactéries à Gram négatif correspond au lipide A du LPS, la colistine peut aisément fixer l'endotoxine et ainsi inhiber son effet toxique [82].

5. Spectre d'activité

La colistine à un spectre d'activité étroit limité aux bacilles à Gram négatif. En effet, elle possède une excellente activité bactéricide sur la plupart des bacilles à Gram négatif notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter sp.*, *P.aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

Cependant, *Burkholderia cepacia*, *Proteus sp.*, *Providencia sp.*, *Serratia sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Morganella morgannii*, *Pseudomonas mallei*, *Chromobacterium sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Brucella sp.*, *Legionella sp.*, *Campylobacter sp.* et *Vibrio cholerae* sont naturellement résistantes à la colistine. De plus, la colistine n'est pas active sur les cocci à Gram positif ou négatif, les bacilles à Gram positif, les anaérobies, les champignons et les parasites [11].

6. Les tests de sensibilité à la colistine

6.1. Méthodes de dilution

6.1.1. Méthode de dilution en milieu liquide

C'est la seule technique de référence préconisée par les deux comités (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) et European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la colistine [83]. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé de 0.5 Mc Farland dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou dans des cupules (méthode de microdilution) contenant des concentrations croissantes de la colistine selon une progression géométrique de raison 2 plus le milieu Müeller-Hinton liquide ajusté en cations (MHLAC). Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance bactérienne n'est visible à l'œil nu [84]. La CMI obtenue est ensuite comparée à des concentrations critiques déterminées par CLSI ou l'EUCAST afin de catégoriser la souche bactérienne (Sensible, Intermédiaire ou Résistante).

6.1.2. Méthodes de dilution en milieu solide

Plusieurs études ont employé cette technique comme méthode de référence, cependant le comité joint CLSI-EUCAST a récemment décidé que cette méthode n'était pas recommandée pour déterminer la sensibilité de la colistine [83].

Elle consiste à étudier la croissance d'une suspension bactérienne standardisée sur gélose Müller-Hinton (MH) contenant différentes concentrations de la colistine (0,125 mg/L à 512 mg/L). Après incubation, la CMI de chaque souche testée est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique [85].

Des méthodes alternatives sont beaucoup plus utilisées dans de nombreux laboratoires à fin de déterminer la sensibilité à la colistine telles que la méthode des disques, E-test et les systèmes automatisés.

❖ Méthode des disques

C'est une méthode de diffusion d'une quantité donnée de la colistine à partir d'un disque imprégné de cette dernière dans une gélose MH ensemencée avec une suspension bactérienne standardisée. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré et comparé à la valeur critique selon les recommandations de CLSI et/ou EUCAST [86].

Il s'agit d'une technique très utilisée en routine dans les laboratoires puisque elle est facile à réaliser et peu coûteuse. Cependant la mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose en raison de leur poids moléculaire élevée rend cette méthode inappropriée pour tester la sensibilité à la colistine car elle donne des résultats faussement sensibles [83].

❖ Bandelettes E-test (bio-Mérieux)

Il s'agit d'une méthode qui permet la détermination de la CMI de la colistine par diffusion en milieu gélosé. Elle consiste à déposer la bandelette de la colistine contenant un gradient de concentration allant de 0,016 à 256 µg / mL à la surface de gélose MH inoculée par la souche testée. Après incubation, une zone d'inhibition est

observée en forme d'une ellipse répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette. Le point d'intersection entre la bandelette et l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition indique la CMI [86].

Cette méthode est facile à exécuter au laboratoire mais elle est relativement coûteuse et ne détecte pas de manière fiable les souches résistantes à la colistine.

Plusieurs études, révèlent des résultats variables concernant la fiabilité de cette technique sur des souches résistantes à la colistine. En effet, des études montrent une excellente corrélation entre E-test et la technique de référence. Cependant, d'autres études énoncent des taux élevés de fausse sensibilité (jusqu'à 32%) par rapport à celle retrouvée par la méthode de dilution [87].

❖ **Systèmes automatisés**

Plusieurs systèmes automatisés permettent aussi de déterminer la sensibilité à la colistine. Certaines donnent des résultats rapides pendant (3-16 h) grâce à des systèmes de détection optique qui détectent des changements fins de croissance bactérienne comme le Vitek 2 et le BD Phoenix. Tandis que d'autres, telle que le MicroScan et le Sensititre sont des systèmes dont l'incubation est plus longue (16 à 24 h) [83].

➤ **Système Vitek 2 (bio-Mérieux)**

- Ce système utilise des panels de concentrations allant de 0,5 à 16 mg/L pour la colistine [88].
- La turbidimétrie liée à la croissance bactérienne est lue toutes les 15 min.
- Les résultats sont exprimés entre 4 et 10 h après le début de l'incubation.
- Présentent une faible sensibilité pour détecter les souches résistantes et hétéro-résistantes à la colistine comparée aux méthodes de dilutions en raison de taux de résultats de fausses sensibilités très importants (36 %) [89].

➤ **Système BD Phoenix (BD Diagnostics)**

- Utilise des panels testant des concentrations de colistine de 0,5 à 4 mg/L [88].
- Les panels peuvent être inoculés de façon manuelle ou automatisée et les résultats sont exprimés entre 6 et 16 h après le début de l'incubation [90].

➤ **Système MicroScan (Beckman Coulter Diagnostics)**

- Utilise des panels testant des concentrations de colistine de 2 et 4 mg/L.
- Les panels sont inoculés manuellement et incubés dans l'instrument pendant 16 à 20 heures [88].

7. Mécanisme de résistance à la colistine

7.1. Résistance naturelle

➤ ***Bacillus polymyxa subspecies colistinus*** : C'est l'espèce productrice de la colistine, il est naturellement résistant à cette dernière grâce à la production d'une enzyme appelé la colistinase [91].

➤ ***Proteus et Serratia marcescens***

La résistance naturelle à la colistine chez ces deux espèces est se faite par l'addition d'un groupement phospho-éthanolamine et/ou 4-amino-4-deoxy-L-arabinose sur le lipide A, ce qui augmente la charge positive du lipopolysaccharide (LPS) bactérien diminuant ainsi l'affinité des polymyxines qui sont elle-même cationiques. Cette addition est liée à l'activation de l'opéron *pmrHFIJKLM* et du gène *eptB* [92,93].

7.2. Résistances acquises

Cette résistance dans la plupart des cas due à l'addition de groupements cationiques au lipide A du lipopolysaccharide. Cette addition peut être due à des mutations chromosomiques ou par l'acquisition des gènes portés par des plasmides.

7.2.1. Résistances chromosomiques

➤ **Modification de lipopolysaccharide**

○ **Addition du groupement cationique à la surface du LPS**

L'addition des groupements phospho-éthanolamine (pEtN), L-amino-4-arabinose (LAra4N) et galactosamine sur les LPS est médiée par différents gènes selon les espèces.

- **Gène *pmrC*** : Chez *K. pneumoniae* et *A. baumannii* ce gène est le premier gène de l'opéron *pmrCAB* qui code pour trois protéines : PmrC, la protéine régulatrice PmrA, la protéine kinase senseur membranaire PmrB. La protéine PmrC est une amino-transférase qui ajoute un groupement pEtN sur le LPS [94].

- **Gènes *eptA* chez *E. coli* et *P. aeruginosa* et *eptB* chez *E. coli*** : codent pour des Amino-transférases qui ajoutent un groupement pEtN sur le LPS [95].

- **Gène *naxD*** : Chez *A. baumannii* ce gène code pour une déacétylase qui synthétise et ajoute un groupement galactosamine sur le LPS [96].
- **Opéron *arnBCADTEF*** : chez toutes les espèces sauf *A. baumannii* cet opéron code pour un total de sept protéines qui synthétisent et ajoutent un groupement LAra4N sur le LPS [95].

- **Modifications médiée par les systèmes à deux composants (SDC)**

- ✓ **Système à deux composants PmrAB**

Ce système est activés lorsque la bactérie est phagocytée par les macrophages, c'est-à-dire quand elle est intracellulaire [94]. Pour s'adapter à l'environnement il nécessite des fortes concentrations en $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}/\text{H}^+$ chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, ou faible concentration en $\text{MgCl}_2/\text{CaCl}_2$ chez *P. aeruginosa*. La protéine senseur PmrB est activée par autophosphorylation et active alors à son tour la protéine régulatrice PmrA par phosphorylation [94, 97, 98].

Des mutations au sein des gènes *pmrA* et *pmrB* sont impliquées dans l'acquisition de résistances à la colistine chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *P.aeruginosa* et *A.baumannii*. Ces mutations entraînent une activation constitutive du régulon PmrAB et donc la production de groupements cationiques et la modification du LPS (Figure 3 et 4) [99].

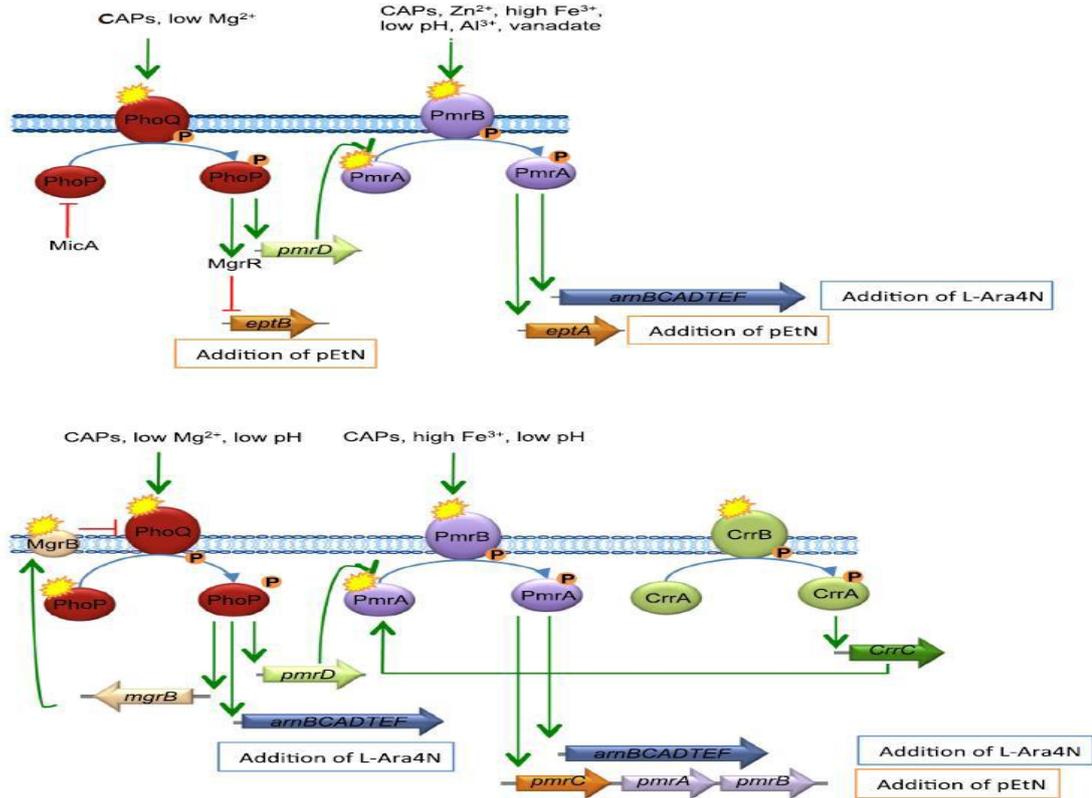


Figure 3 : Régulation de la résistance à la colistine :a) *E. coli* ;b) *K.pneumoniae* [100].

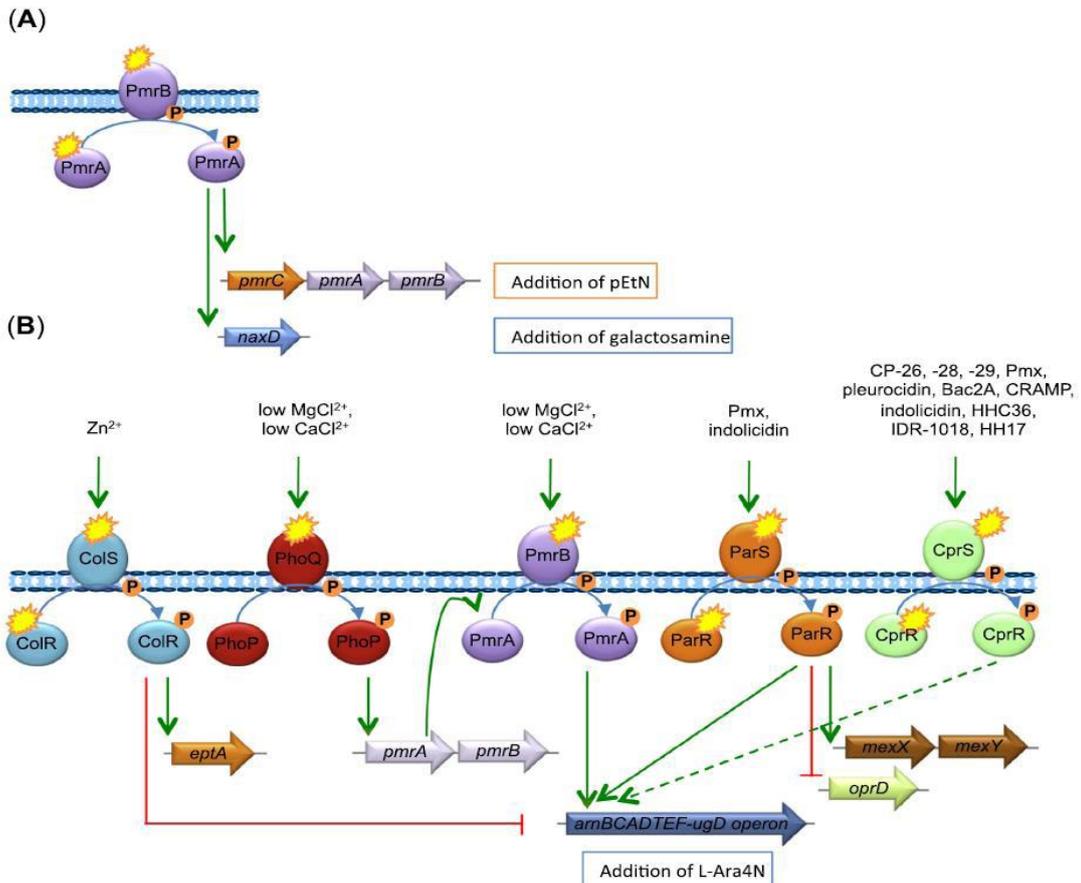


Figure 4 : Régulation de la résistance à la colistine :a) *A. baumannii* ;b) *P.aeruginosa* [100].

✓ **Système à deux composants PhoPQ**

L'opéron PhoPQ code pour deux protéines : une protéine régulatrice PhoP et une protéine kinase [101,102].

L'activation de la protéine PhoP active à son tour le gène *eptB* et l'opéron *pmrHFIJKLM* chez *E. coli* chez *K. pneumoniae* respectivement ce qui conduit à la synthèse de pEtN et de LAra4N respectivement (Figure 3).

Chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, la protéine PhoP peut aussi activer indirectement la protéine PmrA par l'intermédiaire de la protéine PmrD. L'activation de la protéine PmrA conduit à la synthèse de pEtN et de LAra4N.

Chez *P. aeruginosa* la protéine PhoP active directement la protéine PmrA, ce qui conduit à la synthèse de LAra4N (Figure 4).

Des mutations au sein des gènes *phoP* et *phoQ* sont impliquées dans l'acquisition de résistances à la colistine chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *P. aeruginosa*. Ces mutations entraînent une activation constitutive du régulon PhoPQ et par conséquent la production des groupements cationiques et la modification du LPS.

➤ **Système à deux composants CrrAB**

L'opéron *crrAB* est présent uniquement dans le génome de certaines souches de *K. pneumoniae*. Le gène *crrB* peuvent subir des mutations responsable à l'acquisition de résistances de haut niveau à la colistine chez *K. pneumoniae*. Ces mutations entraînent une activation constitutive du régulon PmrAB par l'intermédiaire d'un connecteur CrrC et donc la production des groupements pEtN et LAra4N et modification du LPS (Figure 3) [103,104].

➤ **Système à deux composants ParRS**

Chez *P. aeruginosa* l'opéron *parRS* code pour deux protéines : une protéine régulatrice ParR et une protéine kinase senseur membranaire ParS. Pour s'adapter à l'environnement (présence d'indolicidine et concentrations sub-inhibitrices de colistine ou de polymyxine B), la protéine senseur ParS est activée par autophosphorylation et active alors à son tour la protéine régulatrice ParR par phosphorylation. Cette dernière active l'opéron *pmrHFIJKLM*, ce qui conduit à la synthèse de LAra4N [105].

➤ **Système à deux composants CprRS**

Une protéine senseur CprS est activée par autophosphorylation et active alors à son tour la protéine régulatrice CprR par phosphorylation [105]. Cette dernière active l'opéron *pmrHFIJKLM*, ce qui entraîne la synthèse de LAra4N. L'inactivation du gène *phoQ* couplée à des altérations des gènes *cprR* et *cprS* est impliquée dans l'acquisition de résistances à la colistine chez *P. aeruginosa* [106].

➤ **Système à deux composants ColRS**

Ce système pour s'adapter à l'environnement nécessite la présence d'ions zinc, le protéine senseur membranaire ColS est activée par autophosphorylation et active alors à son tour la protéine régulatrice ColR par phosphorylation. La protéine ColR active la transcription du gène *eptA* et réprime la transcription de l'opéron *pmrHFIJKLM* (Figure.4), ce qui conduit à la synthèse de pEtN comme décrit précédemment. L'inactivation du gène *phoQ* couplée à des altérations des gènes *colR* et *colS* ce qui conduit à l'acquisition de la résistance à la colistine chez *P. aeruginosa* [106].

○ **Modification de l'acétylation du LPS**

Chez *K. pneumoniae* des mutations dans le gène *lpxM* qui est responsable de l'addition de chaîne acétyle sur le lipide A des entérobactéries peuvent être responsables de l'acquisition de résistances à la colistine chez *K. pneumoniae* [107].

○ **Augmentation de la production du LPS**

Chez *K. pneumoniae* le gène *yciM* est un régulateur de la synthèse du LPS. Des mutations dans ce gène sont responsables de l'acquisition de résistances à la colistine [107].

○ **Absence de la production de LPS**

Chez *A. baumannii*, des mutations incluant la substitution ou la délétion d'un nucléotide et l'insertion d'un élément ISAbal1, au sein des gènes de biosynthèse de lipide A : *lpxA*, *lpxC* et *lpxD*. Ces mutations menées à la perte complète de la production de LPS. Etant donné que le lipide A est la cible initiale de la colistine, son

absence conduit à la perte du site ciblé par la colistine et à un niveau élevé de résistance [108].

➤ **Modifications de la capsule polysaccharidique (CPS)**

➤ **Hyperproduction de la CPS**

Chez *K. pneumoniae* l'hyperproduction de la CPS confère une résistance à la colistine car elle limite les interactions de cette dernière avec leurs sites de fixation à la surface du LPS [109].

➤ **Libération de la CPS**

Chez *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, la libération de la CPS anionique entraîne la capture des peptides antimicrobiens cationiques, réduisant ainsi la quantité de peptides antimicrobiens qui atteint la surface bactérienne et empêchant ainsi leur interaction électrostatique avec la surface du LPS. La CPS est reliée à la surface bactérienne par une interaction ionique avec le LPS et cette interaction est stabilisée par des cations divalents. Il est donc probable que la libération de la CPS en présence de la colistine s'explique par la perturbation des ponts ioniques cation-dépendants entre les molécules de LPS [110,111].

➤ **Implication des pompes d'efflux**

Des études ont montré que la surexpression de certaines pompes d'efflux telle qu'AcrAB et KpnEF pouvait contribuer à la résistance à la colistine. De plus, des études révèlent que l'ajout d'inhibiteurs de pompes d'efflux diminue la survie des bactéries en présence de la colistine [104].

7.2.2. Résistance plasmidique

Récemment, en 2015 on rapporté le premier mécanisme de résistance à la colistine à médiation plasmidique porté par le gène *mcr-1* (mobile colistin resistance gene) décrit en Chine chez des porcs et des poulets, ainsi que chez des souches bactériennes isolées chez des être humains. La prévalence de ce gène plasmidique a été estimée à environ 20% chez l'animal et autour de 1% chez l'homme. Par la suite, neuf gènes *mcr* supplémentaires (*mcr-2* à *mcr-10*) sont identifiés chez différents espèces d'entérobactéries. Le gène *mcr* code pour une enzyme de type phospho-éthanolamine transférase qui conduit à l'addition de phospho-éthanolamine au lipide A du LPS,

modifiant sa charge et réduisant ainsi son affinité avec la colistine et donc à une diminution de la sensibilité [112].

➤ **Gène de résistance plasmidique *mcr-1***

Il est de taille moléculaire de (1646 Pb). Il peut être porté sur différents types de plasmides (IncX4, IncI2, IncHI2, IncF, IncY, et IncP). L'espèce progéniteur du gène *mcr-1* semble être du genre *Moraxella* en raison de la forte homologie entre les séquences d'acide aminée de la protéine MCR-1 avec les phospho-éthanolamines transférases de *Moraxella sp* [112].

➤ **Gène de résistance plasmidique *mcr-2***

Il est détecté pour la première fois chez des souches *E.coli* d'origine animale en Belgique. Présente une taille moléculaire de (1 617 pb) et porté par un plasmide conjugatif de type IncX4, au sein d'une séquence d'insertion de type IS1595. Le gène *mcr-2* présente une identité nucléotidique de 77.3% et une identité d'acides aminés de 81.0% avec *mcr-1*.

L'espèce progéniteur supposée du gène *mcr-2* est *Moraxella pluranimalium* car l'élément génétique mobile IS1595 a été identifié chez *M. pluranimalium* et l'analyse phylogénétique de MCR-2 a révélé une forte homologie (99 % d'identité protéique) avec une phospho-éthanolamine transférase de *M. pluranimalium* [113].

➤ **Gène de résistance plasmidique *mcr-3***

Il a été découvert en chine chez une souche *E. coli* isolé à partir de porcs. Il est porté par un plasmide de type IncHI2 portant un transposon TnAs2. Le gène *mcr-3* montre une identité de séquence nucléotidique de 45% et 47% avec *mcr-1* et *mcr-2*, respectivement. Tandis que les séquences des acides aminés montrent une identité de 99.8% à 100% et de 75.6 % à 94.8% avec les phospho-éthanolamines transférases trouvées dans d'autres espèces d'entérobactéries et dans 10 espèces d'*Aeromonas*, respectivement [114].

➤ **Gène de résistance plasmidique *mcr-4***

Il est détecté chez un sérotype de *Salmonella enterica Typhimurium* isolée à partir de porcs en Italie et dans des souches *E. coli* isolées chez le porc en Espagne et en

Belgique. Il est porté par un plasmide de type ColE10 qui peut être mobilisé à l'aide d'un plasmide conjugatif « helper ». Le progéniteur du gène *mcr-4* serait *Shewanella frigidimarina* car il présente 99% d'identité nucléotidique avec leur génome [115].

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-5*

Il a été découvert dans un sérotype de *S. enterica* Paratyphi B isolée à partir de volaille et l'alimentation en Allemagne. Il fait probablement parti d'un opéron qui code pour la protéine MCR-5 mais aussi pour une protéine ChrB impliquée dans la résistance au chromate. L'opéron contenant le gène *mcr-5* est localisé sur un transposon de la famille Tn3 porté par un plasmide de type ColE [116].

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-6*

Le *mcr-6* (anciennement connu sous le nom de *mcr-2.2*) a été découvert chez *Moraxella sp.* isolé de porcs en Grande-Bretagne. Par ailleurs, une seule variante de *mcr-6* (*mcr-6.1*) a été identifiée jusqu'à présent [113].

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-7*

Un nouveau gène de résistance à la colistine à médiation plasmidique *mcr-7.1*, partage une identité d'acides aminés à 70% avec le gène *mcr-3*, a été identifié dans trois souches de *K. pneumoniae* isolées de poulets en Chine. Le gène *mcr-7.1* a été trouvé dans un plasmide de type IncI2 (pSC20141012) qui héberge le gène *bla_{CTX-M-55}* dans un isolat. Ce plasmide peut être transféré de *K.pneumoniae* SC20141012 à *Escherichia coli* J53Azr, présentant une augmentation supérieur 8 fois de la CMI de la colistine par rapport au receveur *E. coli* J53Azr [117].

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-8*

Ce gène est détecté chez une souche de *K. pneumoniae* résistante à la colistine et aux carbapénèmes isolée de crachats d'un patient atteinte du syndrome de pneumonie hospitalisé en chine. Il est porté par un plasmide de type IncFII. La coexistence de gène *mcr-8* et *bla_{NDM}* codant pour la carbapénémase a été confirmée dans des isolats de *K. pneumoniae* d'origine animale. La séquence d'acides aminés de protéine MCR-8 a

montré une identité de 31,08%, 30,26%, 39,96%, 37,85%, 33,51%, 30,43% et 37,46% avec MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, MCR-5, MCR-6 et MCR-7, respectivement [118].

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-9*

Il est détecté pour la première fois chez une souche humaine *E.coli*. Il est porté par un plasmide de type IncHI2. La protéine MCR-9 partage 33% à 65% d'identité avec les autres protéines de type (MCR-1 à 8). L'analyse in silico a révélé que le MCR-9 codé par un plasmide qui partage une identité d'acides aminés significative (environ 80%) avec les protéines de type MCR codées chromosomiquement de *Buttiauxella sp.* [119]

➤ Gène de résistance plasmidique *mcr-10*

Il est détecté pour la première fois chez *Enterobacter rogenkampii* isolé à partir d'un patient hospitalisé en chine. Il est porté par un plasmide de type IncFIA. Le gène *mcr-10* présente une identité dans les séquences nucléotidiques et des acides aminés de 79.69% et 82.93 respectivement avec *mcr-9*. La protéine MCR-10 montre aussi une identité d'acides aminés de 79,04% à 83,67% avec les phospho-éthanolamine transférases de type MCR chromosomiquement codées (MCR-B) de diverses espèces de *Buttiauxella* [120].

8. Emergence de la résistance à la colistine chez les bacilles à Gram négatif

Au cours des dix dernières années, l'émergence de la multirésistance aux antibiotiques et notamment aux carbapénèmes chez les entérobactéries, *Pseudomonas sp.* et *Acinetobacter sp.* à engendré le retour à la colistine comme traitement de dernier recours. Cependant, l'utilisation abusive de cette molécule et à des concentrations non optimales contribué à la dissémination rapide de la résistance à la colistine parmi ces agents pathogènes dans différents parties du monde aggravant encore la situation liée à la résistance aux antibiotiques [13].

En Europe, la situation est beaucoup plus inquiétante. En effet, la prévalence de la résistance à la colistine semble parfaitement corrélée à celle aux carbapénèmes. Ainsi, la prévalence de la résistance à la colistine est alarmante de 15 % à 25 % dans

les pays considérés comme endémiques pour les CPE (Grèce ou Italie). En Grèce entre 2007 et 2010 le taux de résistance à la colistine chez des souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénèmases de type KPC est de 18.6 %. Cette résistance est en constante augmentation. Lors d'une enquête nationale réalisée en 2011 en Italie, 22.4 % des souches productrices de carbapénèmases sont résistantes à la colistine et 43% en 2013-2014 [13].

En Espagne, une étude réalisée entre 2011 et 2012 révèle un taux très élevée de résistance à la colistine de 13.5 à 31.7% parmi des souches de *K.pneumoniae* productrices de carbapénèmase type VIM-1 [121].

En France, une enquête nationale effectuée en 2014 sur des souches de *K. pneumoniae* et *Enterobacter sp.* productrices de carbapénèmases révèle un taux élevé de résistance à la colistine de 6.2% et 7.7%, respectivement [122].

Les données du programme de surveillance EARS-Net en 2015 montrent un taux moyen de résistance à la colistine de l'ordre de 1% pour *P. aeruginosa* et de 4% à 9% chez *Acinetobacter sp* [3].

En Amérique, la plupart des rapports des États-Unis indiquent que les taux de résistance pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii* sont inférieurs à 5,5% [123]. Cependant, dans d'autres pays d'Amérique du Sud, dont le Brésil et le Chili, ce taux de résistance allant jusqu'à 9% pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii* [123].

Une étude réalisée entre 2009 et 2011 aux États-Unis montre une prévalence de la résistance à la colistine de 0.1 % chez des souches de *K. pneumoniae*. Cependant, cette prévalence est beaucoup plus importante passant 2.4 % chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE [13]. Ce taux dépasse 11.5 % chez les souches de *Klebsiella sp.* productrices de BLSE durant la période 2009-2012 [13].

En Argentine, la surveillance nationale de la résistance aux antibiotiques menée par le WHONET-Argentina Network qui regroupant 90 laboratoires montre une augmentation significative de la résistance à la colistine chez *E. coli* dépasse 0.4 % en 2012 et 0.8 % en 2014 [13].

En Asie, des études multicentriques réalisées dans plusieurs pays de la zone Asie-Pacifique rapportent des taux de résistance à la colistine de 0.3 % en 2009 et 2 %

en 2011 pour *E. coli*, de 1.5 % pour *Klebsiella sp.* et de 25 % pour *Enterobacter sp.*[13].

En Corée du Sud, le taux de résistance à la colistine est plus important de 7.8 % chez des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes [124]. En Chine, une étude multicentrique (12 hôpitaux) montre une prévalence de résistance à la colistine de 0.5 % chez les entérobactéries. En revanche, cette prévalence pouvait être largement augmentée (5 %) chez les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes [13]. Une étude thaïlandaise réalisée sur 55 souches (*E. coli* + *K. pneumoniae*) productrices de BLSE rapporte une forte prévalence de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* (7.8%) alors que toutes les souches *E. coli* sont sensibles à cette molécule [13]. Les données iraniennes décrivent un taux de résistant à la colistine de 11.6% chez *A. Baumannii* [123].

En Afrique, les études réalisées sur la résistance à la colistine sont rares. En effet, des études menées au Nigéria et en Afrique du Sud ont rapporté que le taux de résistance à la colistine est inférieur à 10% [123]. En Tunisie, la prévalence de cette résistance est de 0.09%, 1.2% et 1.5% chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, respectivement [123]. En Algérie et Égypte, cette prévalence est de l'ordre de 2.3%, 2.9% respectivement [125]. Cependant, les données cumulatives de deux hôpitaux à Zimbabwe ont rapporté des taux de résistance très élevés de 53 % pour *P. aeruginosa* [123].

Cependant, l'utilisation de la colistine en monothérapie s'est accompagnée d'une augmentation non négligeable de la fréquence d'isolement de souches résistantes à la colistine. L'une des solutions pour surmonter le problème de résistance et prévenir l'efficacité de la colistine est l'utilisation en thérapeutique d'associations d'antibiotiques à base de colistine.

Chapitre III: Associations d'antibiotiques à base de la colistine

1. Généralités

Lors de la prescription de l'antibiothérapie une des questions qui se pose : « dois-je prescrire un ou plusieurs antibiotiques? ». Devant la gravité potentielle d'une infection bactérienne, il est naturel de vouloir recourir à une association d'antibiotiques. Face à l'augmentation de la résistance bactérienne, se traduisant dans la pratique hospitalière par une augmentation de la morbidité et de la mortalité, la juste prescription des antibiotiques, dont le recours aux associations fait partie, est indispensable.

Les concepts de synergie et d'antagonisme sont des notions relativement vieilles, antérieures à la découverte des antibiotiques. En 1872, Fraser mettait en avant l'action antagoniste de l'« Atropia » sur l'effet létal de la Physostigma chez le lapin (atropine et éserine). Il ne s'agissait pas d'antibiotiques, mais il posait les bases d'un antagonisme entre deux molécules. En matière d'antibiothérapie, les premières constatations d'une interaction entre deux antibiotiques datent des années 1950, avec les travaux de Gunnison *et al.*, et Jawetz et Gunnison qui ont défini les interactions comme synergiques, antagonistes ou additives [20].

Aujourd'hui, les notions de synergie et d'antagonisme peuvent être envisagées selon le regard du microbiologiste ou du clinicien. Le premier va les définir en terme de concentration minimale inhibitrice (CMI) ou bactéricide (CMB), avec des effets mesurés *in vitro*, le second en terme de guérison du patient ou d'échec clinique. Ces dernières peuvent être cohérentes avec les résultats obtenus *in vitro* mais aussi les contredire. De même, ces tests *in vitro* peuvent difficilement préjuger des effets annexes des antibiotiques, tels que l'inhibition de la synthèse de toxines bactériennes [20].

2. Intérêts des associations d'antibiotiques

- **Élargissement du spectre antibactérien**

C'est l'objectif recherché le plus facile à atteindre, particulièrement dans le cadre de l'antibiothérapie probabiliste et du traitement des infections polymicrobienne à flore mixte aérobie et anaérobie. Il est particulièrement justifié avec des antibiotiques à spectre étroit.

L'association permettra de couvrir tous les germes éventuellement en cause, ce qui ne pourrait être fait avec un seul antibiotique. Par ailleurs, pour les patients fragiles, il faut rapidement couvrir toutes les espèces potentiellement en cause, dans l'attente des résultats de l'antibiogramme. Cela évite de perdre du temps, ce qui pourrait être délétère pour ce type de patients [126 , 20].

- **Obtenir une synergie**

La synergie résulte d'une interaction positive entre deux antibiotiques dont l'action antibactérienne conjointe est supérieure à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément. Une synergie ou un antagonisme observés *in vitro* ne sont pas toujours extrapolables en clinique. En effet, les conditions d'action *in vivo* de deux antibiotiques peuvent être influencées par des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques mal pris en compte *in vitro*.

Les données expérimentales *in vitro*, à condition de reproduire des caractéristiques pharmacocinétiques proches de celles obtenues chez l'homme, permettent d'approcher l'intérêt potentiel d'une association.

In vitro, on observe une synergie essentiellement en associant deux antibiotiques bactéricides. La synergie d'une association vis-à-vis d'une espèce bactérienne n'est pas extrapolable à une autre espèce [126 131].

- **La prévention de l'émergence de souches résistantes**

En ce qui concerne la prévention de l'émergence de souches résistantes, tout découle du fait qu'il peut exister au sein d'une population bactérienne un certain nombre de germes qui possèdent, avant la mise en route d'un traitement antibiotique, une (des) mutation(s) susceptible(s) de leur conférer une résistance au traitement.

L'utilisation de cet antibiotique sur cette population va sélectionner les bactéries chez qui préexiste déjà la mutation et entraîner l'émergence, à partir de ces germes, d'une population résistante à l'antibiotique utilisé. La prescription d'une association d'antibiotiques permet de diminuer l'émergence de ces mutants résistants, comme par exemple dans la tuberculose. En effet, la probabilité de sélectionner des mutants

résistants aux deux antibiotiques au cours d'une association est à peu près égale au produit des probabilités de mutation de résistance pour chaque molécule [126].

- **Diminution de la toxicité**

Il n'est pas envisageable de diminuer la toxicité d'un antibiotique en l'associant avec un autre. En effet, comme pour tout autre médicament, le risque d'interaction médicamenteuse peut exister. Il sera d'autant moins important que ces antibiotiques auront un risque métabolique faible, qu'ils seront pas ou peu inhibiteurs enzymatiques et que leur marge thérapeutique sera suffisamment large. Cependant nous visant la diminution de la toxicité de chaque antibiotique individuellement par usage à des concentrations sub-inhibitrices [126].

3. Types d'activités d'antibiotiques

Quand on associe un antibiotique A avec un antibiotique B il en résulte sur le plan bactériologique quatre types d'interactions :

1. Synergique: l'effet de l'association est supérieurs à la somme des effets de chaque antibiotique étudié seule à la même concentration [20].

2. Additif : l'effet de l'association est égale à la somme des effets de chaque antibiotique étudié de façon isolée à la même concentration que dans l'association [20].

3. Indifférent : l'activité de l'un des deux antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre [20].

4. Antagoniste : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration [20].

4. Méthodes d'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne des associations d'antibiotiques

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence *in vitro* les différents types d'interaction lors de l'association d'antibiotiques, ces méthodes peuvent être regroupées en deux catégories :

4.1 Méthode de l'échiquier (checkerboard)

Il s'agit d'une méthode de référence réalisée plutôt en milieu liquide qu'en gélose. On fait varier les concentrations des deux antibiotiques dans le milieu de culture. Cela impose de mesurer la CMI pour chacun des deux antibiotiques et pour l'association, et cela en testant de nombreux couples de concentrations différentes.

Les résultats sont exprimés en fonction de Fractionnal Inhibitory Concentration (FIC). Ceci est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{FICI = FICI A + FICI B}$$

$\mathbf{FICI A}$ = CMI A en associations avec B / CMI A seule.

$\mathbf{FICI B}$ = CMI B en associations avec A / CMI B seule.

Les résultats de FICI pour chaque combinaison sont interprétés comme suit :
Si le FIC est inférieur à 0,5 l'association est de type synergique, si le FICI ($0.5 < \text{FICI} \leq 4$) l'association est de type indifférente, si le FICI est supérieur à 4 l'association est antagoniste.

Par un repiquage secondaire sur des milieux sans antibiotiques, il est aussi possible d'étudier l'effet bactéricide de l'association. Cependant, à l'inverse de l'effet bactériostatique, la bactéricide n'est généralement pas proportionnelle à la concentration de l'antibiotique et le nombre de survivants peut demeurer stable pour une large gamme de concentrations [20].

4.2. Méthode de cinétique de bactéricidie (time-killing)

Cette méthode consiste à analyser l'évolution d'un inoculum bactérien à différents intervalles de temps, en présence de différentes concentrations d'antibiotiques seule ou en associations. Le dénombrement bactérien est effectué avant incubation (T0),

après différents temps définis d'incubation à 37°C au cours des 6 premières heures (phase précoce) puis à 24 heures d'incubation (phase tardive). Le dénombrement s'effectue par ensemencement des différentes dilutions géométrique de raison 10 sur milieu gélosé. La cinétique est représentée graphiquement par une courbe indiquant le \log_{10} du nombre d'UFC par ml de culture bactérien en fonction du temps. La courbe dite « témoin » correspond au comportement de l'inoculum bactérien qui ne recevant aucun antibiotique. Cette méthode permet d'apprécier la bactéricidie de façon quantitative et qualitative, l'éventuelle re-croissance bactérien et les effets persistants. Les résultats sont obtenus 24 à 48 heures après, délai nécessaire à la phase de dénombrement. La synergie (critère d'évaluation secondaire) est définie comme une diminution $>2 \log_{10}$ du nombre de colonies entre l'association des deux antibiotiques et l'antibiotique le plus actif seule. Une augmentation $> 2 \log_{10}$ est interprétée comme un antagonisme et une diminution ou augmentation $< 2 \log_{10}$ est considérée comme indifférente. L'activité bactéricide (critère principal) est définie comme une diminution $>3 \log_{10}$ du nombre de colonies dans la combinaison par rapport à l'antibiotique le plus actif à l'état seule (Figure 5) [20].

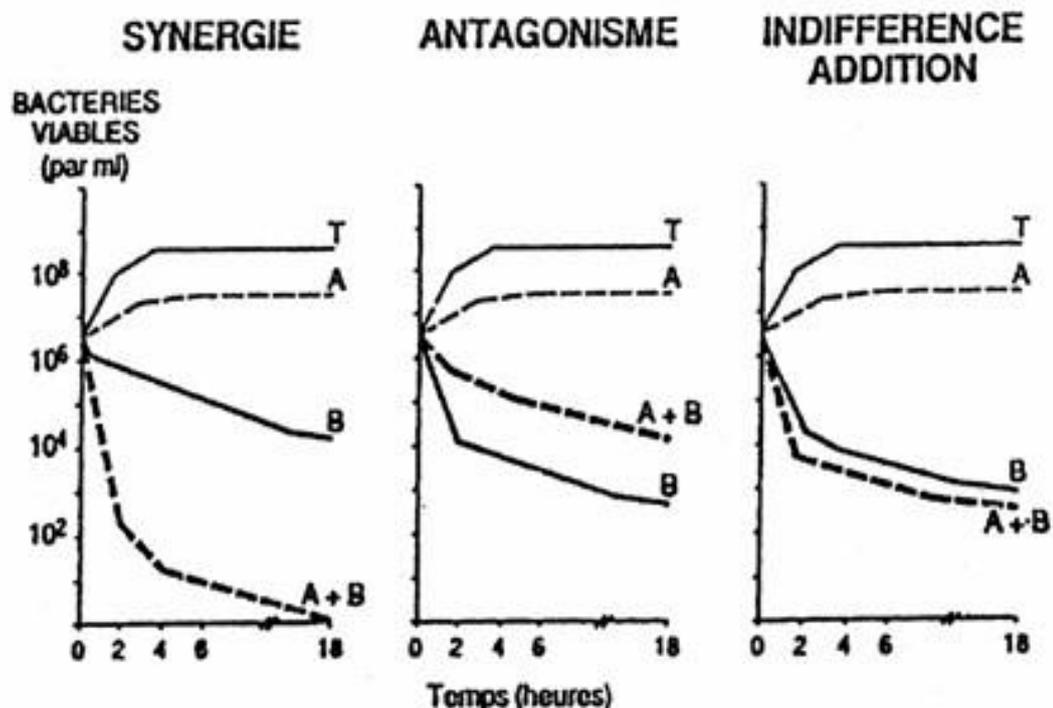


Figure 5 : Types d'associations d'antibiotiques par méthode de cinétique de bactéricidie

4.3. Méthode de l'E-test

Il s'agit d'une méthode plus simple et facile à réaliser et qui est le plus utilisée en routine pour répondre aux demandes des cliniciens. Destinés à déterminer une CMI permet d'étudier facilement l'effet d'une association. Les E-test sont des bandelettes imprégnées d'un gradient croissant d'antibiotique et la CMI est lue à l'intersection de la bandelette et de l'ellipse d'inhibition de croissance. Pour mettre en évidence l'effet de l'association, il faut placer une première bandelette, imprégnée d'un antibiotique A sur la gélose pendant une heure de temps, puis la retirer et placer au même endroit la bandelette imprégnée d'un antibiotique B. S'il y a synergie, il y aura une diminution de la CMI de l'association d'au moins deux dilutions par rapport à celle de l'antibiotique seul le plus actif [127]. La lecture de la CMI des deux antibiotiques en associations s'est faite comme le montre dans la figure 6.

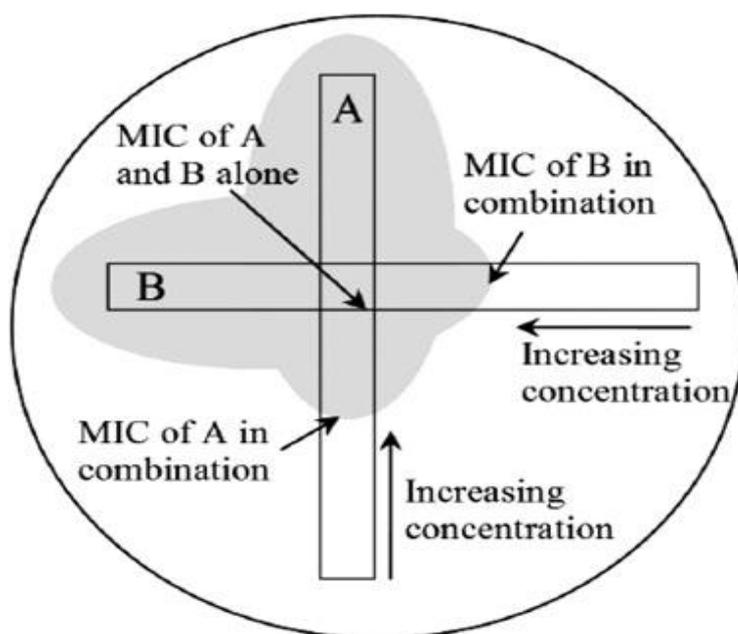


Figure 6 : Associations d'antibiotiques par méthode E-test [127].

4.4. Méthode de bandelettes perpendiculaire

Cette méthode consiste à disposer deux bandes de papier filtre à angle droit sur milieu gélosé (MH)ensemencé avec une suspension bactérienne standardisé. La première bande est imprégnée d'une solution d'antibiotique A à une concentration déterminé et la deuxième imprégnée d'une solution d'antibiotique B à une concentration déterminé.

Après incubation de la boîte, La détermination de type d'association s'est faite par l'observation de l'angle formé entre les deux zones d'inhibition comme le montre dans la figure 7 [128].

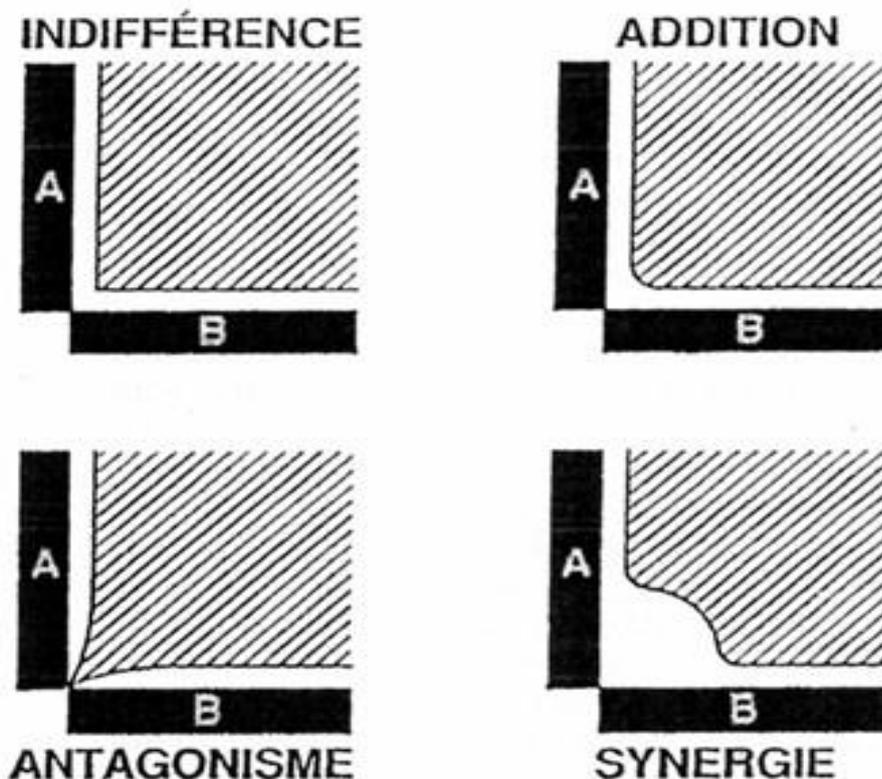


Figure 7 : Associations d'antibiotiques par méthode de bandelettes perpendiculaire [128]

4.5. Méthode par diffusion avec transfert sur cellophane

Cette méthode consiste à disposer deux bandes de papier filtre imprégnées d'une solution d'antibiotique à angle droit sur un milieu gélosé non ensemencé. Après diffusion des antibiotiques, les bandes sont enlevées et on dispose sur la gélose une cellophane préalablement ensemencée avec la souche bactérienne. Au cours de l'incubation, les bactéries se multiplient directement sur la cellophane, sauf dans les zones où les concentrations en antibiotiques inhibent la croissance. Il est ainsi possible d'observer l'effet bactériostatique de l'association sur la souche bactérienne. La cellophane est ensuite transférée sur une gélose dépourvue d'antibiotique et après une nouvelle période d'incubation, on note la croissance des bactéries survivantes. La croissance ou l'absence de croissance dans les zones de diffusion et d'intersection après

transfert permet d'évaluer l'activité bactéricide de chaque antibiotique et de leur association [128].

5. La colistine en associations sur les bacilles à Gram négatif multirésistants

L'utilisation de la colistine en polythérapie c'est-à-dire combinée à un ou plusieurs antibiotiques, pourrait être une alternative thérapeutique pour lutter contre les bacilles à Gram négatif multirésistants. De nombreuses études *in vitro* ont employé l'activité synergique de la colistine en polythérapie. Bien que de nombreux antibiotiques aient été combinés avec la colistine, la rifampicine et les carbapénèmes sont les plus fréquemment utilisés [11].

5.1. Associations colistine- β -lactamines

L'association de la colistine la plus étudiée est celle avec les β -lactamines, notamment les carbapénèmes. Plusieurs études antérieures *in vitro* ont montré que cette association avait une bonne activité antibactérienne sur les bacilles à Gram négatif multirésistants (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*).

Une étude réalisée en Vietnam testé *in vitro* l'activité synergique de l'association de la colistine avec quatre antibiotiques de la familles β -lactamines (ceftazidime, ceftriaxone, imipenem et méropénème) par méthode de l'échiquier (checkerboard) sur 56 souches *Acinetobacter baumannii* résistante aux carbapénèmes isolées à partir des patients atteints de pneumonie associée à la ventilation (PAV) montre un taux de synergie très importants avec les carbapénèmes notamment avec le méropénème de 68% et de 36% avec l'imipenem. Par contre avec les céphalosporines de troisièmes générations le taux de synergie est faible de 7% et 13% pour la ceftazidime et la ceftriaxone, respectivement [129].

De même Gunderson *et al.* et Kroeger *et al.* rapportent aussi une activité synergique très importante lors l'association de la colistine avec les céphalosporines de troisièmes générations (ceftazidime) par méthode cinétique de bactéricidie sur des souches de *P.aeruginosa* et *A.baumannii* multirésistantes [130,131].

Souli *et al.* ont évalué *in vitro* l'activité synergique de la combinaison colistine - l'imipenème par méthode de cinétique de bactéricidie sur 42 souches de

K. pneumoniae productrice de métallob- β -lactamase type VIM-1. L'effet synergique est observé dans 50% des isolats [132].

De même Sopirala *et al.* ont évalué l'activité de la combinaison colistine avec l'imipenem sur 8 isolats d'*A.baumannii* pan-résistants. Une activité synergique très élevée de 100% est observé dans tous les isolats [133].

Jernigan *et al.* (2012) ont évalué l'activité de la colistine (1 $\mu\text{g/mL}$) en association avec le doripénème (8 $\mu\text{g/mL}$) sur 12 *K. pneumoniae* productrices de carbapénèmases. Une synergie est observée dans 50% des souches [134].

Hong *et al.* révèlent une synergie de 42.50% pour l'association colistine - ertapénème et de 67% pour l'association colistine - doripénème sur 12 souches de *K.pneumoniae* productrices de carbapénèmases [135].

5.2. Associations colistine- fluoroquinolones

Actuellement, ce type d'associations testé in vitro dans plusieurs études. Ainsi les résultats obtenus sont variables en fonction de l'espèce considérée et la méthode utilisée. En effet, Ontong *et al.* testent in vitro l'association colistine-levofloxacin et colistine-ciprofloxacine par méthode de l'échiquier sur des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes. Ils ont trouvés un niveau très élevés de synergie de 90.91% pour la combinaison colistine-levofloxacin et de 45.15% pour l'association colistine-ciprofloxacine [136]. Par contre, l'étude menée par Kheshti *et al.* ont rapporté que l'association de la colistine avec la levofloxacin et la ciprofloxacine par la méthode E-test sur des souches *A .baumannii* multirésistantes donne un effet synergique un peu plus faible de 5% et 15% respectivement [137]. Une synergie de 100% est mise en évidence entre la colistine et la ciprofloxacine par méthode de l'échiquier sur des souches de *P.aeruginosa* multirésistantes [138]. D'autres études testent la combinaison colistine- levofloxacin par méthode de cinétique. Ils ont trouvées une synergie de 90.9% sur des souches de *P.aeruginosa* dans les 4 premières heures de croissance [25] et de 84.8% sur *A .baumannii* après 6 h de croissance [139].

5.3. Associations colistine- aminosides

En pratique thérapeutique l'association de la colistine avec les aminosides n'est pas recommandée en raison de la toxicité des deux familles antibactériennes [88 ,140]. Cependant une telle combinaison à permis le traitement d'une méningite à *A. baumannii* multiresistant [141]. Même constat rapportée par des études in vitro et in vivo sur des souches de *P.aeruginosa* multirésistantes [142]. De même Ontong *et al.* ont évalué l'associations de la colistine avec trois antibiotiques de la familles des aminosides (amikacine, gentamicine, tobramycine) par méthode de l'échiquier sur des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes. Ils ont constatés que l'effet synergique est existait dans les trois combinaisons avec des niveaux très élevés. Il est de 81.80 % avec la gentamicine, de 72.72% avec l'amikacine et de 45.45% avec la tobramycine [136]. Yu *et al.* montrent un effets synergiques de 65% et un effets additifs de 3,25% lors l'association colistine-amikacine sur 39 isolats de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes [143].

5.4. Associations colistine- sulfamides

Plus récemment, il a été démontré que le triméthoprim, le sulfaméthoxazole et le triméthoprim/ sulfaméthoxazole ont une activité synergique in vitro avec la colistine sur les BGN multirésistantes. Dans une étude réalisée sur 164 BGN. La combinaison colistine-sulfaméthoxazole montre un effet synergique de 85.98%. Notant que ces sont sensibles au sulfaméthoxazole. Pour la combinaison colistine - triméthoprim la synergie est détectée sur 72. Par ailleurs, la combinaison colistine - triméthoprim/ sulfaméthoxazole montre un effet synergique de 40.24% [144].

5.5. Associations colistine- rifampicine

Il a été déjà confirmé que l'association in vitro de la rifampicine à d'autres antibiotiques tels que l'imipenem, la ceftazidime et l'ofloxacin donne un effet synergique sur certaines bactéries à Gram négatif multirésistants. L'association colistine- rifampicine donne aussi des résultats prometteur. En effet, un taux de synergie supérieurs à 60% a été annoncé dans une revue systématique [145]. De plus, Kheshti *et al.* révèlent un taux de synergie de 55% lors l'association rifampicine-colistine sur des souches *A. baumannii* multirésistantes [137] Une autre étude s'intéressant à l'activité antibactérienne in vitro de la colistine combinée à la

rifampicine sur 12 isolats *A.baumannii* résistants aux carbapénèmes à également mis en évidence une synergie sur 26.7% des souches [146].

Une synergie *in vitro* et un effet bactéricide rapide de l'association colistine-rifampicine ont également été mis en évidence sur des souches *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* résistantes à la colistine. Cependant, les concentrations testées en antibiotiques sont bien supérieures à celles réalisables *in vivo* et la valeur clinique de cette combinaison est limitée du fait du risque élevé de néphrotoxicité [11].

5.6. Associations colistine - tétracyclines

Concernant la polythérapie colistine-tigécycline, les études de bactéricidie statique ont mis en évidence une synergie mais celle-ci n'a pas été confirmée par les méthodes cinétiques. En effet, Albur *et al.* n'ont montré aucune modification de l'effet bactéricide avec l'association colistine-tigécycline comparée à la colistine en monothérapie, sur 8 souches *Enterobacteriaceae* productrices de NDM-1. De plus, un antagonisme a été mis en évidence à des faibles concentrations [147].

Zhang *et al.* montrent *in vitro* une synergie entre la colistine et la tigécycline de 10% par méthode de l'échiquier (checkerboard) sur une souche de *K.pneumoniae* résistante aux carbapénèmes et productrice de BLSE type HSV et TEM et possède l'enzyme acc(6')-Ib qui confère une résistance aux quinolones [148]. De même, Ni et collaborateurs testent ce même type d'associations par la même méthode sur des souches *A.baumannii* multirésistantes et révèlent un effet synergique de 24.3% [149]. Dans une autre étude réalisée par Erikci *et al.* un effet synergique de 13% est aperçu lorsque la colistine est associée avec la tigécycline par méthode E-test sur des souches d'*A.baumannii* multirésistantes [150].

5.7. Associations colistine- glycopeptides

Actuellement, de nouvelles combinaisons ont été étudiées *in vitro* en associant la colistine avec des antibiotiques à spectre réduit tels que les glycopeptides et les lipopeptides sur des souches de bacilles à Gram négatif multirésistantes notamment *A.baumannii* [151]. Généralement les glycopeptides et les lipopeptides sont inactifs sur les BGN car il ne pénètre pas dans la membrane externe de ces bactéries. Cependant, des études *in vitro* ont montré une forte synergie entre la colistine et la vancomycine (glycopeptide) sur des souches *A. baumannii* multirésistantes. Ce la est expliqué par la

perturbation de l'intégrité de la membrane externe par la colistine peut améliorer la pénétration des molécules de vancomycine à travers la membrane externe d'*A.baumannii* [152]. Une étude portant sur la synergie colistine-vancomycine par méthode de l'échiquier sur des souches épidémiques d'*A. baumannii* multirésistantes montre que 4/6 souches présentent une synergie [153]. Dans une autre étude, cette association montre aussi une bonne activité synergique sur neuf de dix souches *A. baumannii* résistantes à la colistine [153]. De même Sertcelik *et al.* décrivent une synergie de 17.4% lors l'associations colistine- vancomycine sur des souches *A. baumannii* résistantes aux carbapénemes [152]. Une étude similaire menée par Galani *et al.* évaluent l'efficacité in vitro de la combinaison colistine-daptomycine (lipopeptide) sur dix isolats *A.baumannii* multirésistants ont trouvé Une synergie est observée dans neuf souches [149].

Partie II

Matériels et méthodes

1. Lieu et durée d'étude

Notre étude prospective s'est déroulée au laboratoire de microbiologie faculté de médecine Annaba sur une période de quatre ans allant de janvier 2015 à janvier 2019.

L'étude de la biologie moléculaire a été réalisée au niveau de l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

Au cours de laquelle nous avons traité 900 prélèvements pris chez des patients hospitalisés dans quatre services différents du CHU-Annaba.

- ***Service d'anesthésie-réanimation chirurgicale et service d'urologie*** : Ces deux services se situent au niveau de l'hôpital Ibn Rochd Annaba. C'est une structure hospitalière principale de la wilaya d'Annaba d'une capacité de 466 lits.

Le service de réanimation comprend quatre salles ; deux de six lits et deux de deux lits chacune. Une salle est souvent gardée vide pour la mise en quarantaine.

Le service d'urologie se trouve dans le même bâtiment au 3^{ème} étage composé de 38 lits (10 pour les femmes et 28 pour les hommes).

- ***Service des grands brûlés et service d'endocrinologie*** : Ces services, sis au niveau de l'hôpital Ibn Sina Annaba sont d'une capacité hospitalière de 279 lits abritant les spécialités médicales.

Le service des grands brûlés est au troisième étage aile droite composé de quatorze box individuels. Au même étage au niveau de l'aile gauche se trouve le service d'endocrinologie comprenant quatorze lits pour les femmes et quatorze pour les hommes.

Ces deux hôpitaux constituant le CHU-Annaba accueillent des patients de toute la région Nord-est d'Algérie qui regroupe six wilayas (Guelma, Souk Ahras, El-Tarf, Skikda, Tébessa et Annaba).

Les spécimens sont récoltés chez des patients sur orientation des médecins traitants qui suspectent chez eux une infection. Chaque prélèvement inclus dans l'étude est accompagné par une fiche technique descriptive (Annexe 1).

2. Techniques de Prélèvement

➤ Prélèvements de pus

On a réalisé quatre types de prélèvements de pus (pus de brûlés, pus de pied diabétique, pus de site opératoire, pus de PPD (Prélèvement Protégé Distale). Dans le cas d'une plaie superficielle fermée le pus est récupéré au centre de la plaie par ponction à l'aide d'une seringue stérile et cela après un nettoyage rigoureux et débridage de la peau si nécessaire. A partir des abcès, des plaies superficielles ou des fistules où le pus s'écoule à l'extérieur, le prélèvement est alors fait à l'aide d'un écouvillon après désinfection de la plaie [155]. Pour les PPD l'extrémité de la sonde est coupée à deux centimètres.

Les échantillons ainsi recueillis sont directement introduits dans des tubes de bouillon glucosé tamponné (BGT).

➤ Prélèvement des urines

Le recueil des urines est effectué par ponction à l'aide d'une seringue dans la paroi de la sonde après désinfection chez les patients sondés ou néphrostomie. Le tube est fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans la demi-heure qui suit, sinon il faut le placer dans un glacière [156].

➤ Prélèvement rectale

Dans ce cas on réalise des prélèvements à l'aide d'un écouvillon stérile, introduit au niveau intra-rectal et par des frottements répétés et délicats de la muqueuse. L'écouvillon est directement introduit dans le tube de BGT.

➤ Prélèvement vaginale

La patiente devra éviter toute toilette intime, tout traitement local, il faut aussi qu'elle évite le prélèvement pendant la période menstruelle car la flore est modifiée. Un écouvillon stérile doit être utilisé à la fois. On introduit l'écouvillon au niveau intra-vaginal et on frotte la muqueuse. L'écouvillon par la suite est introduit directement dans le tube de BGT.

Tableau 1 : Type et nombre de prélèvements

Type de prélèvements	Nombre de prélèvements
Pus divers	420
Urine	300
Prélèvement rectale	120
Prélèvement vaginale	60

3. Acheminement des prélèvements

Après étiquetage des tubes contenant les prélèvements, ces derniers sont rapidement acheminés au laboratoire où l'étude est immédiatement entreprise.

4. Isolement et identification des souches bactériennes

Les échantillons parvenus au laboratoire sont disposés dans l'étuve à 35°C pour une pré-culture de deux heures. Après quoi, un isolement systématique à la surface de milieux solides (gélose nutritive, gélose Mac Conkey, gélose Hektoen) après qu'une agitation délicate des tubes soit entreprise.

Les boîtes ainsiensemencées sont incubées à 35°C pendant 18 heures en aérobie.

Après incubation, l'identification des colonies apparues est effectuée selon les tests usuels de bactériologie : un examen macroscopique (aspect des colonies, fermentation ou non du lactose), puis un examen microscopique (état frais, coloration de Gram), test de recherche de catalase et d'oxydase.

L'identification biochimique des bacilles à Gram négatif ainsi recueillis se fait par deux méthodes :

- *La première*- par système API-20E pour les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, et API-20NE pour les bactéries non fermentantes.
- *La deuxième* - est faite par spectrométrie de masse (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight mass Spectrometry Method = MALDI-TOF MS) (Microflex, Bruker 3Daltonics, Bremen, Germany).

4.1. Identification par système API (Bio-Mérieux, France)

C'est une galerie miniaturisée utilisées pour étudier les différents caractères biochimiques des bactéries et ainsi permettre de les identifier à l'aide d'une base de données. Ce système est très pratique surtout en milieu clinique permettant une caractérisation rapide. Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe 2 et 3) et l'identification obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Bio-Mérieux SA**) [157].

4.2. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex)

C'est un spectromètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption /**I**onisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = **T**ime-**O**f-**F**light mass spectrometry). La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), en microbiologie clinique, est l'identification des microorganismes par l'analyse de leurs protéines totales. La spectrométrie de masse combinée à une désorption- ionisation laser assistée par une matrice, d'une bactérie isolée, permet de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision [158].

Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes, collectées est le suivant :

- **Nettoyage de la plaque – cible** : on commence par le rinçage de la plaque avec de l'eau chaude, et à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier. Ensuite, on plonge la cible dans l'éthanol pendant 15 min, puis on la frotte avec 500µl de TFA (Acide Tri – Flurocétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

➤ **Préparation de la matrice :**

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident. Dans cette étude, nous avons utilisé, sous une hotte chimique, un protocole de préparation de la matrice. Dans un tube Eppendorf, on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide.
- 500 µl d'acetonitril HPLC.
- 250 µl de TFA à 10% (acide trifluoroacétique).
- 250 µl d'eau HPLC.
- Soniquer pendant 10 minutes dans un Bain à ultrasons.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM.
- Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre. Ainsi la matrice est prête à être utilisée.

➤ **Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométriques :**

- Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), on prélève les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.

- On dépose 2µl de matrice sur chaque spot.
- On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

➤ **Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF :**

- La cible est ensuite introduite dans l'appareil (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous- vide, aux tris du laser.

- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

➤ **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique :**

MALDI TOF identifie les micro- organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très

abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par la MALDI TOF est >1.9 (Figure 8) [158].

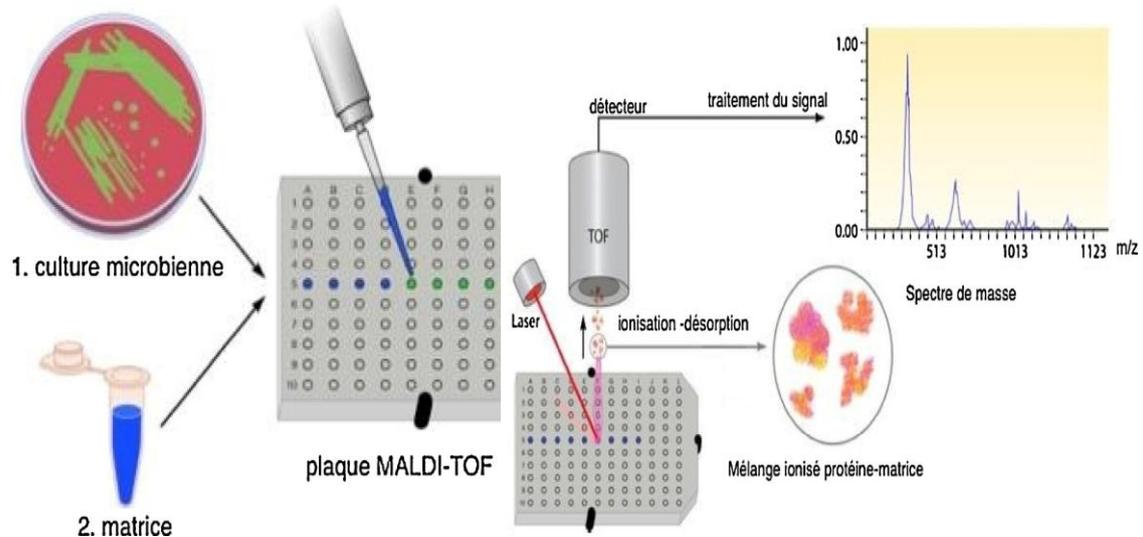


Figure 8 : Protocole d'identification des souches isolées par (MALDI-TOF) [159]

5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées est détectée par méthode de diffusion sur milieu solide Muller-Hinton (MH) selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018 [160].

Technique

➤ Préparation de l'inoculum et ensemencement

A partir d'une culture pure et jeune de 18 h, on prélève à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées et on les décharge dans 5 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (10^6 à 10^8 bactéries/ml). On ensemence ensuite la surface du milieu gélosé MH par stries serrées à l'aide d'un écouvillon trois fois avec un changement d'angle de 60° à chaque fois.

➤ **Application des disques d'ATB:**

Les disques d'antibiotiques sont appliqués à l'aide d'une pince stérile en appuyant légèrement.

Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 18 h.

➤ **Lecture:**

La lecture est effectuée par la mesure avec précision à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparant les résultats aux valeurs critiques figurant dans (Tableau 2, 3, 4) [160]. Puis les bactéries sont classées dans l'une des catégories: Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) [160].

Deux souches de référence sont utilisées pour contrôler les paramètres de conformité des disques d'antibiotiques: *Escherichia coli* ATCC 25922 pour les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour les BGN non fermentants.

Tableau 2: Diamètre critique des zones d'inhibition pour les *Enterobacteriaceae*

La famille	Antibiotiques	Abréviation	Charge de disques µg	Interprétation	
				Sensible (S) ≥	Résistante (R) ≤
Les β-lactamines	Amoxicilline	AMX	20	19	19
	amoxicilline+acide clavulanique	AMC	20/10	18	13
	pipéracilline /tazobactam	TZP	100/10	21	17
	Céfépime	FEP	30	25	18
	Céfotaxime	CTX	30	26	22
	Ceftazidime	CAZ	30	21	17
	Ceftriaxone	CRO	30	23	19
	Ertapénème	ERT	10	22	18
	Imipenème	IMP	10	23	19
	Aztreonam	ATM	30	21	17
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	26	21
	Levofloxacine	LEV	5	21	16
Aminoglycosides	Amikacine	AK	30	17	14
	Gentamycine	GEN	10	15	12
Polymyxines	Colistine	COL	/	/	/
Sulfamides	triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1,25-23,75	16	10
Autre	fosfomycine	FOS	200	16	12

Tableau 3 : Diamètre critique des zones d'inhibition pour *P.aeruginosa*

La famille	Antibiotiques	Abréviation	Charge de disques µg	Interprétation	
				Sensible (S) ≥	Résistante (R) ≤
Les β-lactamines	Ticarcilline	TIC	75	18	18
	Ticarcilline acide clavulanique	TCC	75/10	24	15
	pipéracilline /tazobactam	TZP	100/10	21	20
	Céfépime	FEP	30	18	14
	Ceftazidime	CAZ	10	18	14
	Aztréonam	ATM	30	22	15
	Imipenème	IMP	10	19	15
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	25	18
	Levofloxacine	LEV	5	22	14
Aminoglycosides	Amikacine	AK	30	17	14
	Gentamycine	GEN	10	15	12
	Tobramycine	TOB	10	15	12
Polymyxines	Colistine	COL	/	/	/

Tableau 4 : Diamètre critique des zones d'inhibition pour *A.baumannii*

La famille	Antibiotiques	Abréviation	Charge de disques µg	Interprétation	
				Sensible (S) ≥	Résistante (R) <
Les β-lactamines	Ticarcilline	TIC	75	21	18
	Ticarcilline acide clavulanique	TCC	75/10	20	14
	pipéracilline /tazobactam	TZP	30/6	21	17
	Céfépime	FEP	30	18	14
	Céfotaxime	CTX	30	23	14
	Ceftazidime	CAZ	10	18	14
	Ceftriaxone	CRO	30	21	13
	Imipenème	IMP	10	22	18
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5	21	15
	Levofloxacine	LEV	5	17	13
Aminoglycosides	Amikacine	AK	30	17	14
	Gentamycine	GEN	10	15	12
	Tobramycine	TOB	10	15	12
Polymyxines	Colistine	COL	/	/	/

6. Recherche phénotypique des enzymes de résistance aux β -lactamines

6.1. Production de β -lactamases à Spectre Etendu (BLSE)

Sur la base des résultats de l'antibiogramme et en cas de diminution de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE sont mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les tests suivants.

6.1.1. Test de synergie

Ce test consiste à la recherche d'éventuelles images de synergie en « **bouchon de champagne** » pouvant apparaître entre les disques d'une céphalosporine de 3^{ème} génération ou un monobactam et celui de l'Amoxicilline-acid clavulanique (AMC) pour les *Enterobacteriaceae* ou la Ticarcilline-acid clavulanique (TCC) pour les BGN non fermentants.

La recherche de cette synergie est faite dans les conditions standards de l'antibiogramme, en déposant un disque d'AMC ou TCC à 30 mm centre à centre d'un disque de CTX, CAZ, CRO et ATM, sur gélose MH. Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 18h [161].

La production de BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC ou TCC et les C3G (Figure 9).

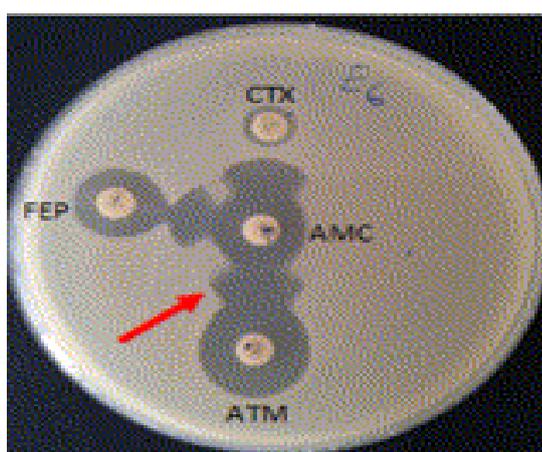


Figure 9 : Test de synergie positif (production de BLSE) [162].

6.1.2. Test à la cloxacilline

Pour les souches résistantes ou de sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de 3^{ème} génération en l'absence de synergie entre ces molécules et l'acide clavulanique une BLSE peut être masquée par production des céphalosporinases. Dans ce cas la révélation de BLSE se fait par ensemencement de la souche testée sur une boîte contenant 18 ml de milieu gélosée MH additionné de 2 ml de la solution cloxacilline (25 mg de cloxacilline + 10 ml d'eau distillée) pour les entérobactéries du groupe 1 et 2. Cependant pour les entérobactéries du groupe 3 la solution cloxacilline se prépare comme la suit (30 mg de cloxacilline + 10 ml d'eau distillée) [85].

6.2. Production de carbapénèmases

La production d'une carbapénémase est systématiquement recherchée chez toutes les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite aux carbapénèmes par le test de Hodge.

6.2.1. Test de Hodge modifié

Une dilution au 1/10^{ème} de la suspension d'*E.coli* ATCC 25922 est préparée puis ensemencée sur gélose MH. Un disque d'imipénème ou d'ertapénème est déposé au centre de la boîte. La souche testée et les deux souches de référence (*K.pneumoniae* carbapénémase positive, *K.pneumoniae* carbapénémase négative) sont ensemencées de manière radiale à partir du disque jusqu'au bord de la boîte puis incubée à 35°C pendant 18 h.

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie de la souche testée et la culture d'*E.coli* indique la présence d'une carbapénémase (Figure 10) [163].

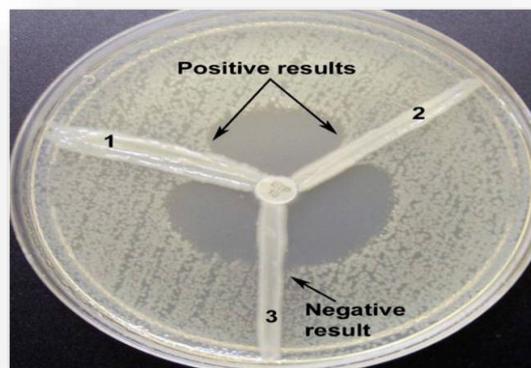


Figure 10: Test d'Hodge modifié positif [164]

6.2.2. Production des métallo- β -lactamases (M β L)

✓ Test à l'EDTA-IMP

Dans une boîte de gélose MHensemencée avec la souche testée. Un disque d'imipénème (10 μ g) est déposé à deux centimètres d'un disque d'imipénème auquel on ajoute 4 μ l d'EDTA (solution 0.5M, pH 8). Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 18 h d'incubation à 35 °C.

Si le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur d'au moins 6 mm à celui obtenu avec le disque d'IPM seul, la souche est considérée comme productrice de métallo β -lactamases (Figure 11) [165].

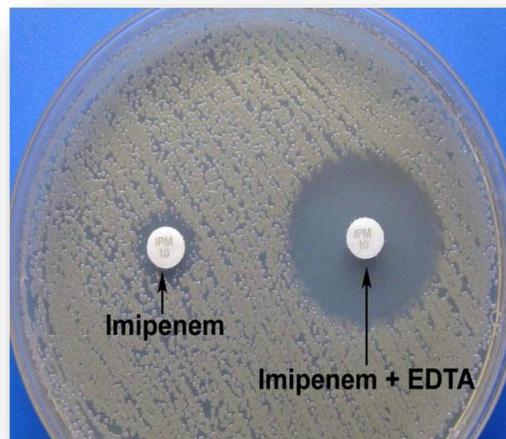


Figure 11 : principe du test à l'EDTA [164].

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par :

7.1. E-test

Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé permet de donner une mesure précise de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique déterminé. C'est une technique rapide et très utile en pratique de routine de laboratoire.

Le système E-test consiste en une bandelette en plastique prête à l'emploi, inerte et non poreux, imprégnée d'un gradient de concentration d'antibiotiques. Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0.016 à 256 μ g/ml ou bien de 0.002 à 32 μ g/ml selon l'antibiotique.

Technique

➤ **Préparation de l'inoculum**

On prépare une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile équivalente au standard 0,5 MF à partir d'une culture pure de 18 h.

➤ **Ensemencement et dépôt de la bandelette E-test**

On ensemence par écouvillonnage à la surface de la gélose MH. Puis on laisse 15 à 20 minutes pour que l'excès d'humidité soit absorbé avant d'appliquer les bandelettes de gradient E-test.

On retire les bandelettes des étuis avec une pince stérile par la partie supérieure et on les dépose à la surface de la gélose ensemencée. En commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique.

Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette. Par ailleurs on évite de déplacer la bandelette une fois appliquée.

Incuber la boîte pendant 18 h à 35°C.

➤ **Lecture et interprétation**

Une zone d'inhibition est observée après incubation en forme d'une ellipse répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette. Le point d'intersection entre la bandelette et l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition indique la CMI (Figure12) [85].

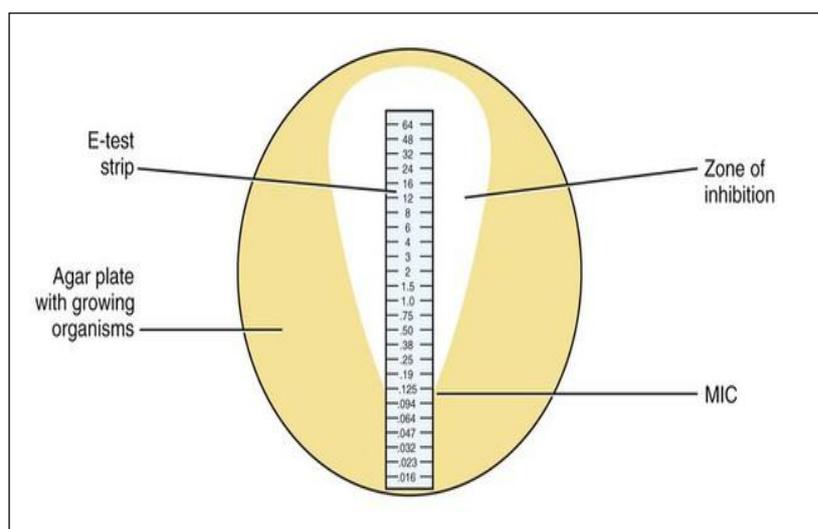


Figure 12: Détermination de la CMI par E-test [166].

La souche est alors classée dans l'une des catégories : sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I) selon les recommandations de CLSI [160].

Dans la présente étude cette méthode est utilisée seulement pour tester la sensibilité à l'imipenème.

Les souches de référence *E.coli* ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25953 sont utilisés pour le contrôle de qualité.

7.2. Dilution en milieu liquide (macrodilution)

Consiste en la culture d'une souche bactérienne dans le milieu Muller Hinton liquide (MHL) en présence de concentrations déterminées d'antibiotique. C'est une technique jumelle à la microdilution mais la lecture est beaucoup plus aisée vu l'importance des volumes.

Technique

➤ Distribution du milieu

- Dans une série de tubes à hémolyse stériles repartir 700 µl de Muller Hinton liquide ajusté en cation (MHLAC). Pour les entérobactéries 20g/l de glucose et 20 mg/l de rouge de phénol (indicateur coloré) sont ajouté lors de la préparation du milieu.

➤ Préparation de la gamme des dilutions d'antibiotiques

- dissoudre 10,24 mg de poudre titrée d'antibiotique dans 10 ml de l'eau distillée stérile, pour obtenir une solution mère à une concentration de 1024 µg/ml.

- A partir de la solution mère, des dilutions semi-logarithmiques de raison 2 sont préparées pour obtenir des concentrations intermédiaires allant de 512 à 0.063 µg/ml.

- Repartir 250 µl de chaque concentration d'antibiotique préparer dans les tubes de MHLAC préalablement préparé (Tableau5).

➤ Préparation de l'inoculum et inoculation

- Préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile équivalent au standard 0,5 MF à partir d'une culture de 18 h. Puis diluer au 1/10^{ème}.
- Ensemencer 50 µl de la suspension bactérienne dans chaque tube de MHLAC avec antibiotique. Pour chaque souche, réaliser un tube témoin sans antibiotique.
 - Boucher les tubes à l'aide d'un couvercle en plastique.
 - Incuber les tubes à 35°C pendant 18 h en aérobiose.

➤ Lecture

La CMI de chaque antibiotique correspond au premier tube clair (pas de culture bactérienne par rapport au témoin sans antibiotique) (Figure 13). Pour les entérobactéries la CMI correspond au premier tube ayant viré au jaune. Comparer la CMI lue, aux CMI critiques correspondant à chaque antibiotique testé. Chez les entérobactéries les valeurs de CMI critiques pour l'imipénème : ≤ 1 (S), 2 (I), ≥ 4(R) ; l'amikacine : ≤ 16 (S), 32 (I), ≥ 64(R); la ciprofloxacine : ≤ 1 (S), 2 (I), ≥ 4(R) et la colistine : ≤ 2 (S), > 2 (R). Chez *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.* les valeurs de CMI critiques sont les même pour l'imipénème : ≤ 4 (S), 8 (I), ≥ 16 (R) ; l'amikacine : ≤ 16 (S), 32 (I), ≥ 64 (R) ; la ciprofloxacine : ≤ 1 (S), 2 (I), ≥ 4(R). Cependant chez *Acinetobacter sp.* les valeurs de CMI de la colistine : ≤ 2 (S), ≥ 4 (R) et chez *Pseudomonas sp.* ≤ 2 (S), 4 (I), ≥ 8 (R) [85].

- Classer les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat.

Tableau 5: Concentrations requises pour la détermination des CMI en milieu liquide

N° de tube	250 µl Solution d'antibiotique de (µg/ml)	Concentration intermédiaire (µg/ml)	Volume MH µl /tube	Inoculum µl /ml	Concentration finale/ tube (µg/ml)*
1	1024	512	700	50	128
2	512	256	700	50	64
3	256	128	700	50	32
4	128	64	700	50	16
5	64	32	700	50	8
6	32	16	700	50	4
7	16	8	700	50	2
8	8	4	700	50	1
9	4	2	700	50	0.5
10	2	1	700	50	0.25
11	1	0.5	700	50	0.125
12	0.5	0.25	700	50	0.063
13	0.25	0.125	700	50	0.032
14	0.125	0.063	700	50	0.016
T			700	50	

(*) : Volume final: 1 ml / tube ; (T) : témoin positif

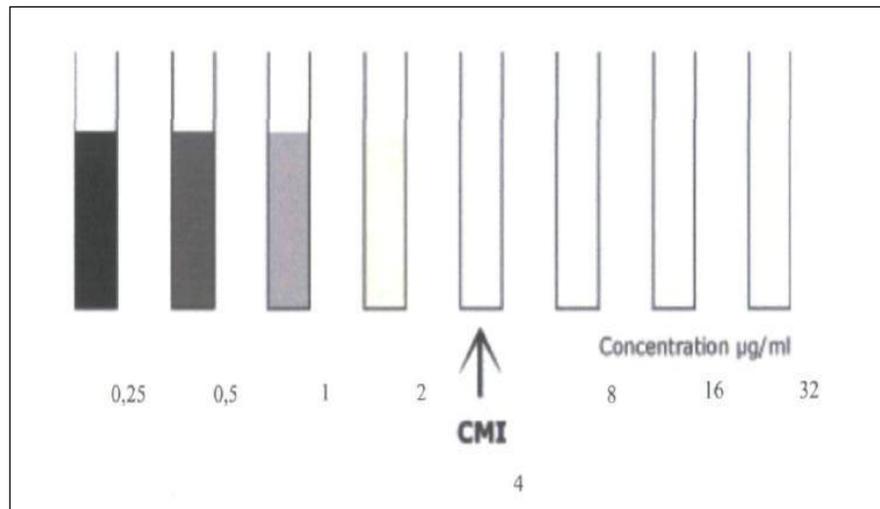


Figure 13 : Détermination de la CMI en milieu liquide par macrodilution [128]

8. Détection moléculaire de gènes de résistance aux β -Lactamine

La recherche des gènes codants pour les β -lactamases à spectre étendu et les carbapénèmases sont effectués par :

8.1. Extraction de l'ADN

Se fait dans une solution tampon renfermant la protéinase K qui vont permettre d'éliminer les protéines et de libérer les acides nucléiques. Quand cette étape est terminée, les acides nucléiques sont capturés par les particules magnétiques qui vont être lavées à plusieurs reprises. Lors de l'éluion, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient.

L'extraction - purification de l'ADN est faite dans l'automate EZ1 (Bio-Robot de QIAGEN) en présence de particules magnétiques permettant d'avoir de l'ADN de haute qualité.

➤ Protocole

- Dans des tubes carrés mettre 190 μ l de Tampon G2, puis additionner 10 μ l de protéinase K.
- Ajouter quelques colonies bactériennes est bien homogénéiser.
- Placer les tubes et les instruments nécessaires dans l'appareil EZ1 et insérer la carte EZ1 DNA Bacteria dans l'automate.
- Choisir le volume d'éluion : 50 μ l.
- Appuyer sur START et suivre les instructions de l'appareil.

8.2. Amplification de l'ADN par Polymérase Chaine Réaction en temps réel (RT-PCR)

C'est une technique qui repose d'une part sur l'amplification des acides désoxyribonucléiques (ADN) par une ADN polymérase à partir d'amorces sens et anti-sens, et d'autre part sur la détection régulière d'un signal fluorescent émis par une sonde TaqMan®, qui porte à son extrémité 5' un Fluorophore et à son extrémité 3' un Quencher. Ce dernier absorbe la fluorescence du Fluorophore.

Un cycle de PCR est composé de trois étapes : la dénaturation de l'ADN, suivie de l'hybridation des amorces à leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Les étapes d'hybridation et d'élongation peuvent être réalisées à la même température. Ce qui permet de réduire considérablement le temps de la RT-PCR.

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation, la polymérase qui possède une activité 5'-exonucléase, va cliver la sonde TaqMan®. Le Fluorophore va donc s'éloigner du Quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émise par le premier, et un signal pourrait être détecté.

L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de Fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmente exponentiellement.

Ceci va se traduire par une courbe de PCR en temps réel, retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR. Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Ensuite, une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes ont été clivées. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, alors, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. Le cycle seuil correspond au nombre de cycle de PCR qui doivent avoir lieu avant le début de la phase exponentielle.

Protocole de la RT-PCR

Le protocole utilisé dans ce travail est le suivant : sur une plaque pour Thermocycleur **Stratagème MX 3000P**, on dépose 20µl du mélange réactionnel (Tableau 6) dans chaque puits. Cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur. Ce dernier est programmé à des températures choisies et pour des périodes déterminées (Figure 14).

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel pour la RT-PCR

Mix RT-PCR pour Une réaction	Quantité PCR en temps réel (µl)
Quantitect Probe PCR Master Mix	10
Amorce Forward	0.5
Amorce Reverse	0.5
Sonde	2
H ₂ O UP	2
ADN à amplifier	5
Volume total	20

bla_{KPC} et *bla_{VIM}* a été ré

La révélation des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}* et *bla_{VIM}* a été réalisé sur les souches BGN productrices de carbapénèmes en utilisant des amorces spécifiques décrites dans le Tableau 7.

Pour valider la réaction de la PCR, des souches de référence sont utilisées :

- *A. baumannii* (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}* and *bla_{OXA-51}*).
- *Klebsiella pneumoniae* UAA2984 (*bla_{VIM}*) (P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France)
- *A. baumannii* UAA2529 (*bla_{IMP}*) (P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France)
- *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 (*bla_{KPC}*) (P. Courvalain Institut Pasteur, Paris, France)
- *Klebsiella pneumoniae* (Kpnasey (*bla_{NDM-1}*))

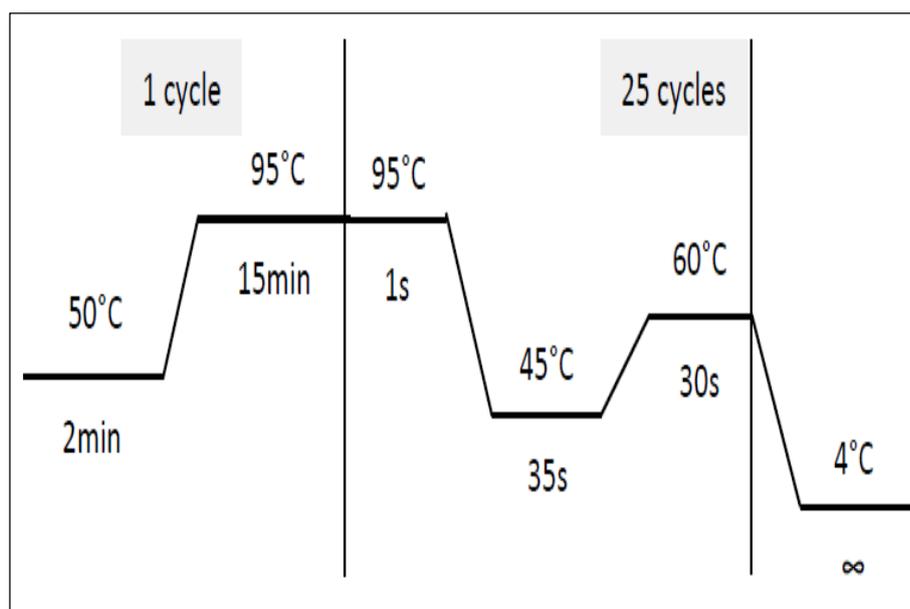
**Figure 14** : Programme de la RT-PCR.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la RT-PCR

Gènes	amorce	Séquence des amorces 5' - 3'	Taille amplicon (pb)	Réf
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA	213	[167]
	TEM-R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA		
	TEM-probe	AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCT-T		
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM-F	CGGGCRATGGCGCARAC	105	[167]
	CTXM-R	TGCRCCGGTSGTATTGCC		
	CTXM-probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC		
<i>Bla_{SHV}</i>	SHV-F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	105	[167]
	SHV-R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT		
	SHV-probe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG		
<i>bla_{OXA-23}</i>	OXA23-F	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	130	[168]
	OXA23-R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC		
	OXA23-probe	FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-TAMRA		
<i>bla_{OXA-24}</i>	OXA24-F	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	123	[168]
	OXA24-R	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT		
	OXA24-probe	FAM- GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA		
<i>bla_{OXA-51}</i>	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	117	[168]
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
	OXA51-probe	FAM-AGCTCGTCGTATTGGACTTGAAGCTC-TAMRA		
<i>bla_{NDM-1}</i>	NDM1-F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155	[169]
	NDM1-R	CAGCCACCAAAGCGATGTC		
	NDM1-probe	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F	GATACCACGTTCCCGTTCTCCA	180	[3]
	KPC-R	GGTCGTTTAGCC		
	KPC-probe	FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA		
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA	132	[3]
	VIM-R	GCGTACGTGCCACYCCAGCC		
	VIM-probe	FAM- AGTCTCCACGCACTTTCATGCCGCGTCGGCG-TAMRA		

(Pb) = paire de base ; (F): Forward ; (R): Reverse ; (Réf): Référence.

8.3. Polymérase Chain Réaction(PCR) standard

Dans le but d'un séquençage de gènes spécifiques une amplification des produits de RT-PCR est réalisée par PCR standard. Cette dernière consiste à une amplification spécifique d'une séquence cible. Les réactions d'amplification des gènes codant pour les carbapénémases sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques, dans un thermocycleur de type BioRad.

➤ **Le protocole :**

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

Dans une plaque pour Thermocycleur BioRad on dépose 25 µl du mélange réactionnel (Tableau 8) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur. Ce dernier est programmé à des températures choisies et pour des périodes déterminées (Figure15).

Le dépistage des gènes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}* et *bla_{VIM-2}* a été réalisé sur les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème en utilisant des amorces spécifiques décrites dans le Tableau 9.

Pour valider la réaction de la PCR standard diverses souches de référence ont été utilisées comme décrit antérieurement.

Tableau 8: Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard

Composants	Quantité PCR standard (µl)
Quantitect Probe PCR Master Mix	12.5
Amorce Forward	0.5
Amorce Reverse	0.5
H ₂ O UP	6.5
ADN à amplifier	5
Volume total	25

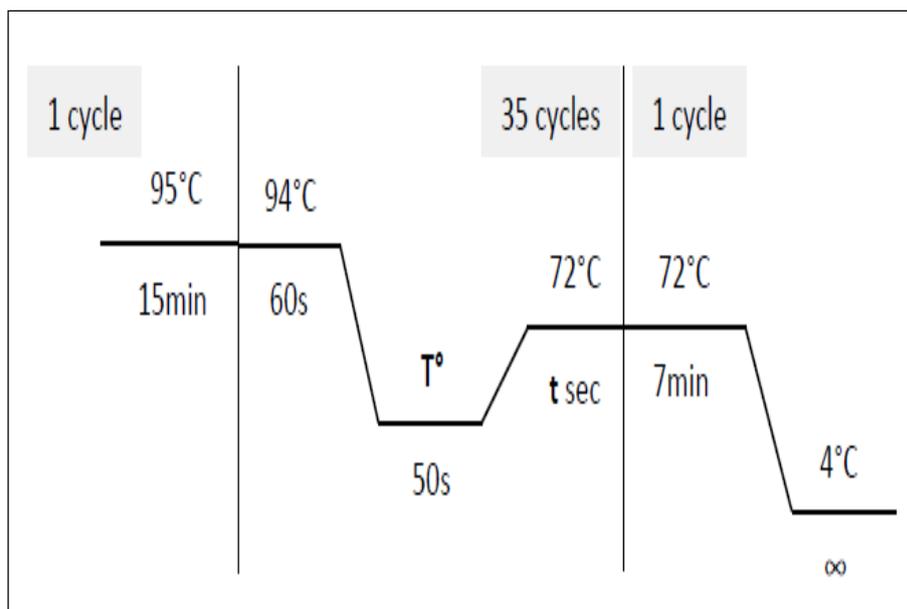


Figure 15 : Programme de la PCR standard

Tableau 9: Amorces utilisées pour la PCR standard

Gènes	amorce	Séquence des amorces 5'- 3'	Taille amplicon (pb)	Réf
<i>bla_{OXA-23}</i>	OXA-23 F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	[170,3]
	OXA-23R	ATTTCTGACCGCTTTCCAT		
<i>bla_{OXA-24}</i>	OXA-24F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825	[171,172]
	OXA-24R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		
<i>bla_{NDM-1}</i>	NDM-1F	CATTTGCGGGGTTTTTAATG	998	[169]
	NDM-1R	CTGGGTCGAGGTCAGGATAG		
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	[3]
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCC		
<i>bla_{VIM-2}</i>	VIM-F	ATTGGTCTATTTGACCGOGTC	780	[3]
	VIM-R	TGCTACTCAACGACTGOGCG		

(Pb) = paire de base ; (F): Forward ; (R): Reverse ; (Réf): Référence.

8.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification de la PCR standards sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. La migration se fait pendant 30 minutes sous un voltage de 135V.

➤ **Protocole de préparation du gel d'agarose**

- Dans un flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400 ml du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) à 0.5X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent et laisser refroidir.
- Ajouter la Solution de bromure d'éthidium BET (3 fois 31.5 µl pour 50 ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes et laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.

➤ **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 0.5X (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier puit.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice.
- Déposer le produit amplifié dans un autre puit et les deux témoins négatif et positif dans d'autres puits.
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (30 min).
- Une fois la migration finie, placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié est comparée avec le marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) et avec les deux témoins.

8.5. Séquençage

Le séquençage est réalisé selon la méthode de Sanger modifiée [173], en utilisant le kit Big Dye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

➤ Purification

Après électrophorèse, on vérifie sur le système d'imagerie à UV, la présence des bandes ADN.

On ajoute au produit PCR 100µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque à filtre pour faire la première purification. Ensuite, on dépose cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Enfin, on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et agite pendant 20 min. Le produit purifié est prêt pour la PCR Big Dye.

➤ PCR BigDye

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le Reverse séparément pour les séquencer par la suite. La réaction se déroule dans un mélange réactionnel BigDye à un volume final de 20 µl (Tableau 10), pareil que pour la PCR standard, le mélange réactionnel est réparti dans les puits de la plaque à PCR et placé dans le thermocycleur. Ce dernier est programmé à des températures choisies et pour des périodes déterminées (Figure 16).

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

Composants pour Forward	Composants pour Reverse	Quantité PCR Big Dye (µl)
Buffer	Buffer	3
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2
Amorce F	Amorce R	1
ADN à amplifier	ADN à amplifier	5
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10
Volume total		20

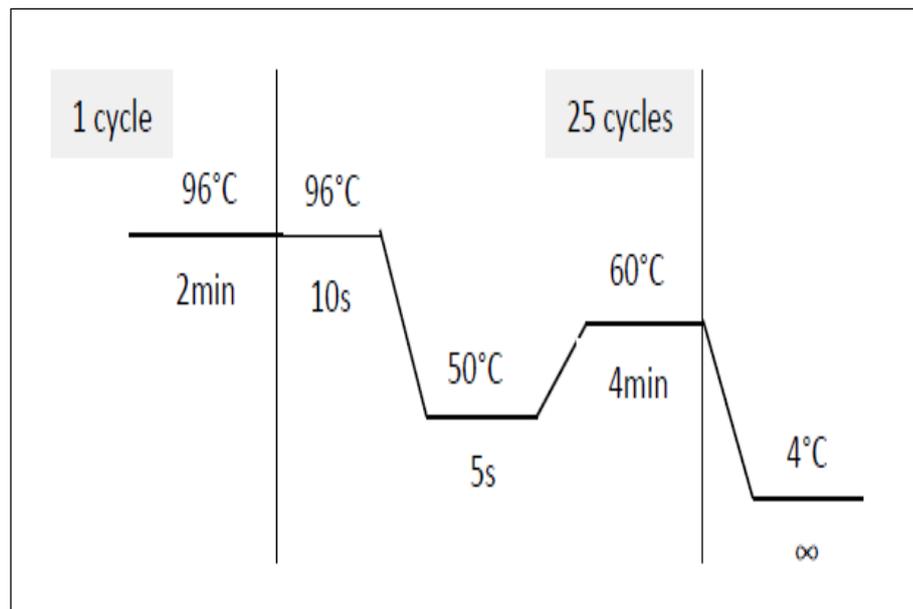


Figure 16: Programme de la PCR Big Dye

➤ Purification par Sephadex

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma, on met la poudre de Sephadex dans les puits de la plaque auxquels on ajoute 300µl d'eau ultra pure et laisser reposer 2 à 3 heures.

Après avoir mis la plaque à filtre au dessous d'une plaque contenant des puits, on réalise une centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté.

On met par la suite, les produits PCR Big Dye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10min à 10°C) les produits PCR purifiés. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

➤ Séquençage

Sur la machine du séquenceur Automate ABI 3730, remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel. Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur **Automate ABI 3730**. Lancer le séquençage.

8.6. Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage ont été analysées et corrigées par le logiciel codon code Aligner. Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du Logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour la comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée «GenBank » [3].

9. Associations des antibiotiques à base de la colistine

9.1. Technique de l'échiquier (cheeckerbord)

Méthode de macrodilution en bouillon

Cette méthode permet de quantifier l'interaction de deux antibiotiques A et B en réalisant l'association d'une gamme de concentration de A et B [174].

Technique

➤ Préparation de la gamme des dilutions d'antibiotiques

- Après déterminations de la CMI des deux antibiotiques testée, des dilutions semi- logarithmiques de raison 2 sont réalisées à base de la CMI de l'antibiotique seul à des concentrations sub-inhibitrice CMI /2, CMI /4, CMI /8, CMI /16 (Tableau 11).

- A l'aide d'une micropipette on prend 125 µl de chaque concentration sub-inhibitrice des deux antibiotiques (A et B) et mettre dans des tubes à hémolyse stérile.

Tableau 11: Association des sub-CMIs de la colistine avec différents antibiotiques

ANT _(b)	CMI _{b/2}	CMI _{b/4}	CMI _{b/8}	CMI _{b/16}
ANT _(a)				
CMI _{a/2}	CMI _{a/2} +CMI _{b/2}	CMI _{a/2} +CMI _{b/4}	CMI _{a/2} +CMI _{b/8}	CMI _{a/2} +CMI _{b/16}
CMI _{a/4}	CMI _{a/4} +CMI _{b/2}	CMI _{a/4} +CMI _{b/4}	CMI _{a/4} +CMI _{b/8}	CMI _{a/4} +CMI _{b/16}
CMI _{a/8}	CMI _{a/8} +CMI _{b/2}	CMI _{a/8} +CMI _{b/4}	CMI _{a/8} +CMI _{b/8}	CMI _{a/8} +CMI _{b/16}
CMI _{a/16}	CMI _{a/16} +CMI _{b/2}	CMI _{a/16} +CMI _{b/4}	CMI _{a/16} +CMI _{b/8}	CMI _{a/16} +CMI _{b/16}

➤ **Préparation de l'inoculum bactérien**

- Préparer à partir d'une culture pure de 18 h, une suspension de la souche à tester, dans 5 ml d'eau physiologique stérile ou dans le bouillon MHLAC, d'une densité équivalente à 0,5 MF (10^8 CFU/ml).

- Diluer la suspension d'opacité 0,5 MF au $1/10^{\text{ème}}$ pour distribuer un inoculum de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml de germe dans chaque tube.

➤ **Inoculation et incubation**

- Inoculer chacun des tubes d'antibiotiques avec 50µl de la suspension bactérienne.

- Ajouter 700 µl de MHLAC dans chaque tube.

- Pour chaque souche, réaliser un tube témoin sans antibiotique.

- Fermer les tubes à l'aide d'un couvercle en plastique.

- Incuber à 35°C pendant 18 h en aérobose.

➤ **Lecture**

- Agitation des tubes

- Examinez chaque tube combiné et notez : une croissance ou pas de croissance pour chaque tube.

- La CMI est la concentration la plus faible des deux antibiotiques combinés montrant une inhibition complète de la croissance.

➤ **Interprétation**

L'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) pour chacune des trois combinaisons testées est calculé selon la formule suivante:

$$\mathbf{FICI = FICI\ a + FICI\ b}$$

$$\mathbf{FICI\ a = sub\ CMI\ (a + b) / CMI\ a}$$

$$\mathbf{FICI\ b = sub\ CMI\ (b + a) / CMI\ b}$$

Les résultats de FICI pour chaque combinaison sont interprétés comme suit :
FICI \leq 0.5 Synergie, FICI (0.5 < FICI \leq 4) indifférent, FICI > 4 Antagonisme [175].

Deux souches de référence sont utilisées pour contrôler les paramètres de conformité des disques d'antibiotiques: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Partie III

Résultats et discussions

1. Souches bactériennes

L'exploration de 900 prélèvements non redondant effectués chez des patients hospitalisés au niveau de deux hôpitaux d'Annaba (Ibn Rochd et Ibn Sina) durant une période de cinq ans (2015-2019) nous a permis de collectés 560 micro-organismes. Parmi eux les bacilles à Gram négatifs occupent la première place avec un taux d'isollements de 67.86%, suivie par les cocci à Gram positifs 28.57%. Le reste (3.57%) ce sont des levures.

Sur les 380 souches BGN aéro-anaérobies rendues responsables d'infection, 216 sont isolées de patient de l'hôpital Ibn Sina, dont 120 proviennent du service des grands brulées et 96 d'endocrinologie. Les 164 restantes sont issues de patients séjournant à l'hôpital Ibn Rochd, dont 90 isolées du service d'urologie et 74 de l'anesthésie-réanimation chirurgicale (Tableau 12).

Tableau 12 : Répartition des BGN isolées selon l'hôpital et le service

Hôpital	Service	(%)
Ibn Sina	Grand brulée	31.58
	Endocrinologie	25.26
Ibn Rochd	Urologie	23.68
	Anesthésie-REA- Chirurgicale	19.47

Cette situation peut s'expliqué par le faite que ces services sont l'épicentre des infections car ils hébergent des patients affaiblies extrêmement vulnérables pouvant porter des comorbidités, soumis aux agressions bactériennes. Ces dernières sont d'origines multiples le plus souvent le microorganisme fait partie prenante de la microflore du service, sur le matériel, dans l'environnement, apporter par les visiteurs ou même porter par le personnel soignant [165].

Sur la base des résultats de l'antibiogramme 143 souches BGN ce sont révélées multirésistantes (résistantes à au moins un antibiotique de trois familles différentes). Cela représente plus du tiers (37.64%) de toutes les souches BGN incriminées chez ces patients. C'est un taux comparables à celui décrit par des études antérieures en Algérie

par Toumi *et al.* (35%) en 2018 [165]. La même fréquence est rapportée du Maroc par Qassimi *et al.* (33.6%) en 2010 [176] et d'Inde par Slipi *et al.* (33.5%) en 2016 [165]. Cependant, en Algérie en 2017 Bouguenoun *et al.* rapportent des taux deux fois plus importants (76%) [177]. Des auteurs Français communiquent aussi des prévalences élevées de BGN-MR dans de nombreux hôpitaux surtout au niveau des unités de soins intensifs [178].

Tout cela est la conséquence de plusieurs facteurs tel que l'utilisation abusive des antibiotiques à large spectre d'activité pendant des périodes prolongées, et parfois en grand nombre et à large doses, antibiothérapie probabiliste et /ou incomplète qui n'est pas conduite à terme. Aussi pour des raisons économiques.

2. Identification des BGN multirésistants retenus

Il nous est donné de constaté suite aux résultats des divers identifications que les BGN-MR considérés sont pour la plus grande part des espèces fermentantes de la famille des *Enterobacteriaceae* (58.04%). Le reste est associé aux bacilles à Gram négatif oxydatifs (41.96%). Dans des études précédentes réalisées en Algérie [3, 165, 177], au Mali [179], au Maroc [180] et en France [181] les entérobactéries représentent les espèces les plus fréquemment mises en cause. Par contre Sefraoui *et al.*, Mesli *et al.* Zenati *et al.* ont montré la prédominance des BGN-NF dans les infections nosocomiales et l'environnement hospitalier [182,183,184]. Cette différence est certainement liée au type de prélèvements ayant fait l'objet d'analyse.

Parmi les bacilles à Gram négatif fermentaire multirésistants identifiées *E.coli* est la souche la plus fréquemment isolée (32/83 des *Enterobacteriaceae*) (Figure 17).

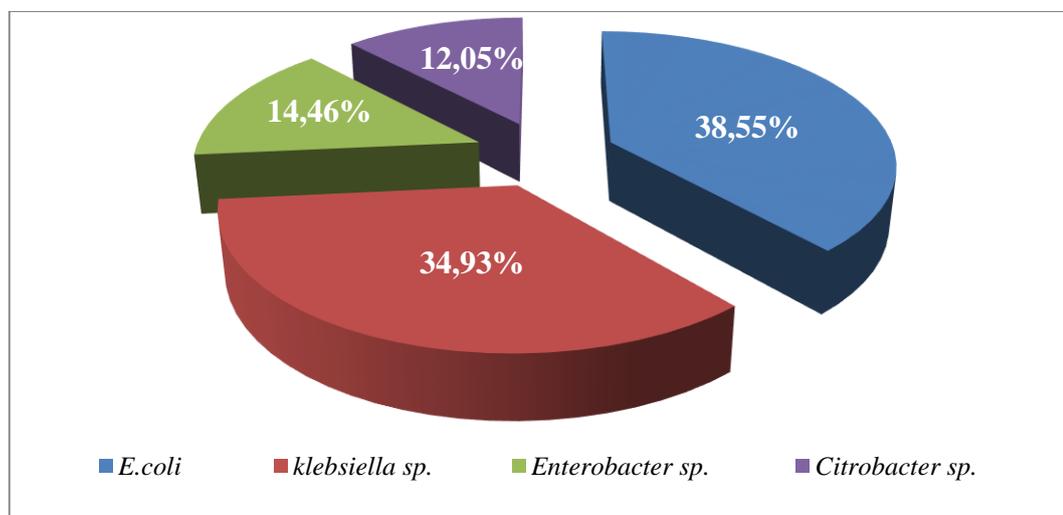


Figure 17 : Répartition des BGN fermentaires multirésistants isolés selon l'espèce

La plupart de souches *E. coli* sont isolées à partir des urines avec un pourcentage de 59.38 %. Le service d'urologie semble être le plus incriminé par ce type de bactérie avec un taux d'isolement de 43.75%. (Tableau13).

Tableau 13 : Origine des souches *E.coli* multirésistantes retenues

N° de Souche	Sexe	Age	prélèvement	Service
1	M	57	Urine	Urologie
2	F	42	Urine	Endocrinologie
3	F	23	Urine	Urologie
4	F	53	Urine	Urologie
5	M	37	Urine	Urologie
6	F	26	Urine	Urologie
7	M	54	Urine	Urologie
8	F	34	PPD	Anesthésie-réanimation
9	F	13	Urine	Endocrinologie
10	M	74	Urine	Urologie
11	F	25	Urine	Urologie
12	M	29	Urine	Urologie
13	F	6	Urine	Anesthésie-réanimation
14	F	35	PV	Endocrinologie
15	M	14	Pus	Brulés
16	M	42	ER	Anesthésie-réanimation
17	F	29	ER	Anesthésie-réanimation
18	M	70	Urine	Urologie
19	F	38	ER	Anesthésie-réanimation
20	M	40	PPD	Anesthésie-réanimation
21	F	6	Urine	Endocrinologie
22	M	61	Urine	Urologie
23	F	53	Urine	Endocrinologie
24	F	64	Pus	Brulés
25	M	51	Urine	Urologie
26	F	23	PV	Endocrinologie
27	F	31	Urine	Urologie
28	M	35	ER	Anesthésie-réanimation
29	F	68	Pus	Brulés
30	F	10	Urine	Urologie
31	M	30	ER	Anesthésie-réanimation
32	F	45	Pus	Brulés

M: Masculin; F: Féminin

Cette prédominance d'*E.coli* multirésistantes est rapportée par plusieurs travaux, mais avec des fréquences d'isollements qui diffèrent d'une étude à l'autre. En effet, *E. coli* multirésistante est à 36.5% mise en cause dans les infections urinaires en Azerbaïdjan rapportées dans l'étude de Sadeghi *et al.* [18]. Dans ce cas le taux d'implication d'*E. coli* est sensiblement supérieur à celui retrouvé à Sétif qui ne dépasse pas les 17% [186]. Ces variations dues certainement aux différences associées à

la taille de l'échantillon, aux sujets prélevés, à la circulation des BMR dans les services et aux caractères propres des infections.

En dehors d'*E.coli* on retrouve aussi *Klebsiella sp.* avec une fréquence d'isolement proche à celle d'*E.coli* (29/83 des entérobactéries) (Figure 16). Les souches de *Klebsiella sp.* sont isolées essentiellement des urines (41.38 %) et de pus avec un taux de 37.93%; échantillons issus majoritairement du service d'urologie avec un pourcentage de 41.38% (Tableau14).

Tableau 14 : Origine des souches de *Klebsiella sp.* multirésistantes retenues

Souche	Sexe	Age	Prélèvement	Service
<i>K. pneumoniae</i>	F	66	Pus	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	57	Pus	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	44	Pus	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	63	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	76	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	51	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	66	Urine	Urologie
<i>K. oxytoca</i>	M	6	Urine	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	F	36	PV	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	50	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	29	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	45	Urine	Urologie
<i>K. oxytoca</i>	M	44	Urine	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	F	29	PV	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	18	Pus	Brulés
<i>K. oxytoca</i>	F	48	Urine	Anesthésie-réanimation
<i>K. oxytoca</i>	F	38	PV	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	F	33	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	21	ER	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	M	30	ER	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	F	69	Pus	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	36	Pus	Brulés
<i>K. pneumoniae</i>	M	67	Pus	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	32	Pus	Brulés
<i>K. pneumoniae</i>	M	41	Urine	Urologie
<i>K. pneumoniae</i>	F	13	Pus	Endocrinologie
<i>K. pneumoniae</i>	M	47	Pus	Urologie
<i>K. oxytoca</i>	F	39	ER	Anesthésie-réanimation
<i>K. pneumoniae</i>	F	52	Pus	Brulés

Cette prévalence est comparable à celui rapporté au Maroc (34%) [187]. Par contre elle est inférieure à celle retrouvée à Tlemcen -Algérie (97.2%) [188] mais elle reste supérieure à ce qui a été trouvé en Tunisie (20%) [187] et en France (26.8%) [189]

On retrouve aussi à moindre fréquence d'isolement et au même niveau des souches *Enterobacter sp.* et *Citrobacter sp.* (12/83 et 10/83 des entérobactéries respectivement) (Figure 16). Ces deux espèces sont pour la majorité des cas (58.33% et 70% respectivement) isolées du pus. Le service des grands brûlés est le plus incriminer avec un taux d'isolement de 41.67%, 40% pour *Enterobacter sp.* et *Citrobacter sp.* respectivement (Tableau 15 et 16).

Tableau 15 : Origine des souches *Enterobacter sp.* multirésistantes retenues

Souches	Sexe	Age	prélèvement	Service
<i>E.cloacae</i>	F	57	Pus	Brulés
<i>E.cloacae</i>	F	42	Urine	Endocrinologie
<i>E.cloacae</i>	M	23	Pus	Brulés
<i>E. aerogenes</i>	M	53	Pus	Brulés
<i>E. aerogenes</i>	M	37	Urine	Urologie
<i>E.cloacae</i>	F	26	Pus	Brulés
<i>E.cloacae</i>	M	54	Pus	Urologie
<i>E.cloacae</i>	F	43	Pus	Anesthésie-réanimation
<i>E.cloacae</i>	F	24	Urine	Endocrinologie
<i>E.cloacae</i>	F	34	Urine	Urologie
<i>E.cloacae</i>	F	36	PV	Endocrinologie
<i>E. aerogenes</i>	M	24	Pus	Brulés

Tableau 16 : Origine des souches *Citrobacter sp.* multirésistantes retenues

Souche	Sexe	Age	prélèvement	Service
<i>C. freundii</i>	M	57	Pus	Brulés
<i>C. freundii</i>	F	42	Pus	Endocrinologie
<i>C. koseri</i>	F	23	Urine	Urologie
<i>C. freundii</i>	F	53	Pus	Brulés
<i>C. freundii</i>	M	37	Pus	Urologie
<i>C. freundii</i>	F	26	Urine	Urologie
<i>C. koseri</i>	M	54	Pus	Brulés
<i>C. koseri</i>	F	34	Pus	Brulés
<i>C. freundii</i>	F	69	Pus	Endocrinologie
<i>C. freundii</i>	M	74	ER	Anesthésie-réanimation

Cette prévalence est supérieur à celle retrouvée dans certaines études, en particulier celle faite à Annaba par Mellouk *et al.* (9% pour *Enterobacter sp.* et 1% pour *Citrobacter sp.*) [3]. Par contre assez différente des résultats de hautes prévalences des souches d'*Enterobacter sp.* et *Citrobacter sp.* ont été rapportées à Tlemcen (39.22%) et à Annaba (47.6%) [190].

Concernent le groupe des bacilles à Gram négatif non fermentaires, il est constitué spécialement de *Pseudomonas aeruginosa* qui représente 65%. Ces souches sont isolées essentiellement de pus (69.23%) recueillis à partir de patients hospitalisé dans le service des Grands brûlés (61.54%) (Tableau17).

Tableau17 : Origine des souches *P. aeruginosa* multirésistantes retenues

N	Sexe	Age	prélèvement	Service
1	F	68	Pus	Brulés
2	F	39	Pus	Brulés
3	H	29	Pus	Brulés
4	H	40	Pus	Brulés
5	H	46	Pus	Brulés
6	H	17	Pus	Brulés
7	H	49	Pus	Brulés
8	H	20	Pus	Brulés
9	H	25	Urine	Urologie
10	F	18	Urine	Urologie
11	F	23	Urine	Urologie
12	F	50	Pus	Brulés
13	H	55	Pus	Endocrinologie
14	H	72	Pus	Brulés
15	F	58	Pus	Brulés
16	F	45	PPD	Anesthésie-réanimation
17	H	59	Pus	Endocrinologie
18	H	41	Pus	Brulés
19	H	78	Urine	Urologie
20	F	21	Pus	Brulés
21	H	19	Pus	Brulés
22	H	33	PPD	Anesthésie-réanimation
23	H	26	Pus	Brulés
24	H	43	Pus	Brulés
25	H	76	Urine	Urologie
26	H	47	Pus	Brulés
27	H	58	PPD	Anesthésie-réanimation
28	F	36	Pus	Brulés
29	H	66	Pus	Endocrinologie
30	F	48	Pus	Brulés
31	F	57	PPD	Anesthésie-réanimation
32	H	51	Pus	Brulés
33	H	63	Pus	Brulés
34	F	42	Pus	Brulés
35	H	53	Urine	Urologie
36	H	57	Pus	Brulés
37	H	44	PPD	Anesthésie-réanimation
38	H	35	PPD	Anesthésie-réanimation
39	F	38	Pus	Brulés

Et par *Acinetobacter baumannii* qui représente 35%. Souches isolées surtout de pus (66.66%) notamment ceux prélevés chez des patients hospitalisés dans le service d'endocrinologie (52.38%) (Tableau 18).

Tableau 18 : Origine des souches d'*A.baumannii* multirésistantes retenues

N	Sexe	Age	prélèvement	Service
1	H	52	Pus	Brulés
2	H	62	Pus	Endocrinologie
3	H	71	Pus	Endocrinologie
4	H	70	Pus	Endocrinologie
5	H	50	Pus	Endocrinologie
6	F	38	Urine	Urologie
7	F	34	Pus	Endocrinologie
8	H	36	Pus	Endocrinologie
9	H	41	Urine	Urologie
10	F	41	Pus	Endocrinologie
11	H	48	Urine	Urologie
12	H	69	Pus	brulés
13	H	49	Pus	Endocrinologie
14	F	52	Urine	Urologie
15	F	33	Pus	Brulés
16	F	29	Urine	Urologie
17	H	84	Pus	Endocrinologie
18	H	63	Pus	Endocrinologie
19	H	36	Urine	Urologie
20	H	55	Pus	Endocrinologie
21	F	74	Urine	Urologie

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Touati *et al.* à Annaba [55] et par Bouguenoun *et al.* à Guelma [177]. Contrairement où certaines études révèlent la dominance des souches *A.baumannii* par rapport au *P. aeruginosa* [165,180, 191].

3. Résistance aux antibiotiques des BGN-MR retenues

3.1. *Enterobacteriaceae*

L'antibiogramme des souches *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.* révèle des taux de résistance très importants vis-à-vis des β -lactamines testés, notamment les céphalosporines de 3^{ème} génération. Mais aussi à l'encontre des aminosides, particulièrement la gentamicine et les fluoroquinolones spécifiquement la ciprofloxacine. En revanche, aucune résistance à la colistine n'a été détectée.

Une résistance très élevée de 100 % et 84.38 % des souches *E.coli* testées à l'amoxicilline et à l'association amoxicilline/acide clavulanique ont été détectées. Elle est comparable à celles rapportées par plusieurs études à l'échelle nationale et

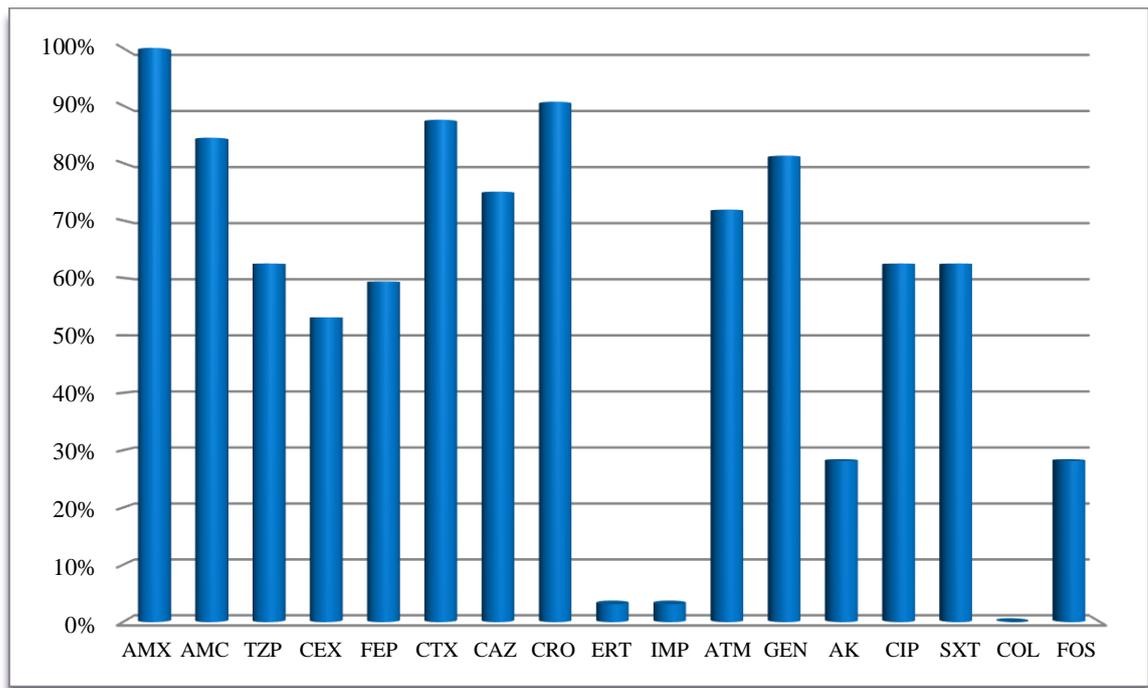
internationale [178, 180, 186]. Ces taux élevés justifient que ces deux antibiotiques ne soient plus actuellement recommandés comme traitement probabiliste des infections dues à *E.coli* notamment dans le cas d'infections urinaires [179]. Plus que ça, le problème s'est étendu aux céphalosporines de 3^{ème} génération où la résistance à la céfotaxime, la ceftazidime et le ceftriaxone atteignent des taux de 87.5%, 75% et 90.63% respectivement. C'est proche des résultats rapportés par Bouguenoun *et al.* en 2017 [177], par Nabti *et al.* en 2019 [186]. En Abidjan, Victoire *et al.* rapportent en 2019 un totale résistance au ceftriaxone et de 98% à la céfotaxime [192].

Tous les professionnels de santé s'accordent à dire que ces molécules constituent l'arsenal de choix dans la lutte contre l'infection dans les services inclus. Tout cela pour leur faible toxicité, leur pouvoir bactéricide ainsi que la diversité de molécules [165].

Les carbapénèmes (ertapénème et imipénème) pour leur part, restent très actives avec un taux de résistance très faible de 3.13%. Une seule souche résistante est isolée de pus de pied diabétique d'un homme de 61 ans amputé est gangréné séjournant au service d'endocrinologie et sous antibiothérapie à base de Tienam et Amikacine. Cet état de résistance aux carbapénèmes est similaire à celui rapporté par Agabou *et al.* en 2014 à Constantine (1.1%) [193], Ainsi, les carbapénèmes restent l'outil de choix dans la prise en charge antibio-thérapeutique. Mais cela ne constitue en rien un passe à une utilisation démesurée. Cela se justifie par le fait qu'en 2016, Mellouk *et al.* rapportent à Annaba et Skikda des taux de résistance plus importants (9.26%) [3] et Bouguenoun *et al.* à Guelma (7.69%) [177].

L'amikacine des aminosides garde une activité appréciable de 71.87% des souches testées. A l'opposé les dites souches présentent une résistance élevée de plus de 81% à la gentamycine. Cet antibiotique est très utilisé dans la majorité des services du CHU Annaba en cas d'infections à Gram négatif. Le taux retrouvé dans notre étude est plus élevé par rapport à celui rapporté en Iran (36.4% pour la gentamycine 36.4% et de 27.3% pour l'Amikacine) [194], en Turquie (78,9% pour la gentamycine et de 18,4% pour l'Amikacine) [194] et par le 16^{ème} rapport du AARN en 2015 (17.25% pour la gentamycine et de 4.48% pour l'amikacine) [195].

Un intérêt particulier à été donné à la ciprofloxacine vue que dans la majorité des cas c'est l'unique fluoroquinolone utilisé dans les structures hospitalières de la ville d'Annaba. On connaît son usage en pneumologie, réanimation et en tant que anticancéreux. Ainsi, on retrouve une résistance élevé de 62.5% à cette molécule. Sachant que c'est le principal antibiotique utilisé pour le traitement des infections urinaires spécialement causé par *E. coli* (Figure 18).



AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, TZP : Pipéracilline+tazobactam, CEX : Céfalexine, FEP : Céfépime, CTX : Céfotaxime, CAZ : Ceftazidime, CRO : Ceftriaxone, ETP : Ertapénème, IMP : Imipénème, ATM : Aztreonam, GN : Gentamycine, AK : Amikacine, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Triméthoprim-sulfaméthoxazole, COL : Colistine, FOS : Fosfomycine.

Figure 18 : Résistance aux antibiotiques de souches *E. coli* multirésistantes isolées.

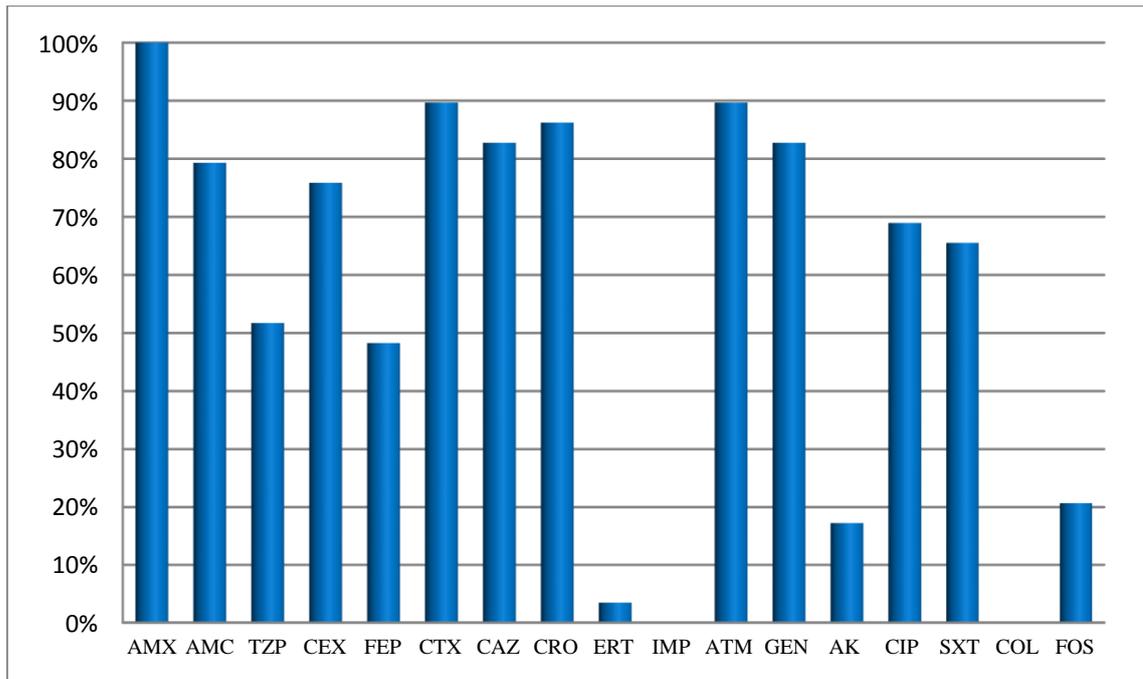
Cependant des souches résistantes à cet antibiotiques ont été aussi isolées du service d'endocrinologie et des grands brûlés. Tout cela ne peut être associé qu'à un usage massif et dans tous les services. Des taux de résistance variables, Très élevé de 75.7% à Sétif [186], moyens de 40% en Chine [196], assez faibles voisins de 19% à Rabat [196] et de 10% aux Etats unis [196].

La résistance est aussi significative chez *Klebsiella sp.* pour la majorité des β -lactamines testées surtout vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération entre autre la céfotaxime, ceftazidime et le ceftriaxone (89.66%, 82.76% et 86.21% respectivement). Les mêmes résultats sont communiqués par des travaux réalisés à Annaba en 2014 où le taux de résistance aux C3G et de 80% [37]. En Tunisie, en 2016 ce taux dépasse les 80% [197]. Au Brésil, en 2016 Ferreira *et al.* montrent que toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées sont résistantes aux C3G [32]. En Europe, le taux de résistance aux C3G de souches *Klebsiella* est en augmentation de 22.6% en France, de 47.7% en Italie et de 70.9% en Grèce [37].

Les souches *Klebsiella* de notre étude sont sensibles aux carbapénèmes testés, seule une exhibe une résistance à l'ertapénème (3.45%). Cette dernière est isolée du pus de pied diabétique d'une femme de 57 ans amputée ayant séjournée dans le service d'endocrinologie et sous une antibiothérapie à base de céfotaxime et gentamicine. Il faut en tenir compte vue la récente introduction de cet antibiotique dans le traitement au pays. A l'échelle nationale, le taux de résistance à l'ertapénème chez *K. pneumoniae* est en augmentation. En effet, Bouguenoun *et al.* dérivent un taux de résistance de 13% vis-à-vis de l'ertapénème dans la ville de Guelma [177]. Mellouk *et al.* rapportent un taux de 20% dans la ville de Annaba [3].

Pour les aminosides on constate une résistance de 82.76 % et de 17.24% à la gentamicine et à l'amikacine respectivement. Ce taux de résistance est supérieur à ceux rapporté par le 16^{ème} rapport de l'ARRN où le taux de résistance à la gentamicine et de 40.77% et à l'amikacine de 12.58% [195]. Par contre Belbel *et al.* révèlent un taux de résistance inférieur à nos résultats pour la gentamicine (56%), mais supérieure pour l'amikacine de 51% [37]. En Europe, ce taux de résistance trouvé à l'égard des aminosides est supérieur à celui trouvé en France (23.6%), en Italie (42.2%), en Grèce (62.9%) et en Espagne (14.1%) [37].

Vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux de résistance de 68.96% a été détecté pour la ciprofloxacine (Figure 19). Ces résultats sont proches de ceux décrits en Chine (64%), en Grèce et en Italie (69%), mais supérieur à ceux rapportés à Annaba (54%), en France (24.4%) et en Espagne (16.5%) [185,37].



AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, TZP : Pipéracilline+tazobactam, CEX : Céfalexine, FEP : Céfépime, CTX : Céfotaxime, CAZ : Ceftazidime, CRO : Ceftriaxone, ETP : Ertapénème, IMP : Imipénème, ATM : Aztreonam, GN : Gentamycine, AK : Amikacine, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Triméthoprim-sulfaméthoxazole, COL : Colistine, FOS : Fosfomycine.

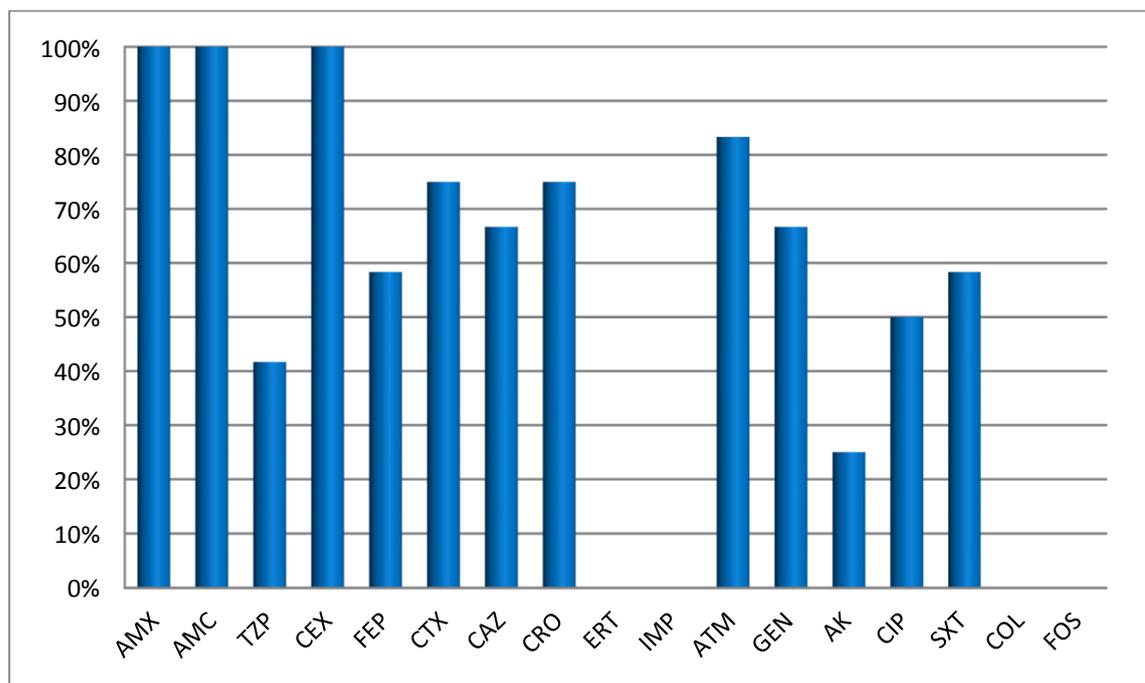
Figure 19 : Résistance aux antibiotiques de souches *Klebsiella sp.* multirésistantes isolées

Sur les souches *Enterobacter sp.* les molécules les plus actives sont les carbapénèmes vis-à-vis desquelles aucune résistance n'a été détectée. Ce que décrit Khennouchi *et al.* dans son étude chez des souches multirésistantes [198]. Par contre Mellouk *et al.* et Victoire *et al.* révèlent chez des souches de même espèce des taux de résistance nettement supérieurs de 46.6% et de 33.3% pour l'ertapénème respectivement [3,192].

Le profil de résistance des souches *Enterobacter sp.* révèle une situation moins alarmante comparativement à celle d'*E.coli* et *Klebsiella sp.* Cependant la résistance naturelle à l'amoxicilline/ acide clavulanique associée à la résistance de 60% à 75% pour les céphalosporines de 3^{ème} génération nous incite à être vigilant concernant cette bactérie. C'est peut-être la raison qui fait que cette dernière est de plus en plus rendue responsable d'infection. Victoire *et al.* révèlent des taux de résistance qui dépassent 80% [192]. Résultats tels ceux rapportés par Khennouchi *et al.* et Ramoul *et al.* où les mêmes espèces isolées de l'est Algérien arboraient un niveau de résistance aux céphalosporines de 66% [198,194].

D'autre part deux tiers des souches sont résistantes à la gentamicine et un quart à l'Amikacine. Ce qui est supérieurs à ceux révélés par le 16^{ème} rapport de l'AARN [195]. Ils sont également plus élevés que ceux rapportés par le système Tunisien de surveillance de l'antibiorésistance qui estime la résistance d'*Enterobacter sp.* à la gentamicine et à l'amikacine de 4.6% et 25.9% respectivement [198].

A la ciprofloxacine la resistance est de 50% et est de 58.33% pour le Triméthoprime/sulfaméthoxazole (Figure 20).



AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, TZP : Pipéracilline+tazobactam, CEX : Céfalexine, FEP : Céfépime, CTX : Céfotaxime, CAZ : Ceftazidime, CRO : Ceftriaxone, ETP : Ertapénème, IMP : Imipénème, ATM : Aztreonam, GN : Gentamicine, AK : Amikacine, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Triméthoprime-sulfaméthoxazole, COL : Colistine, FOS : Fosfomycine.

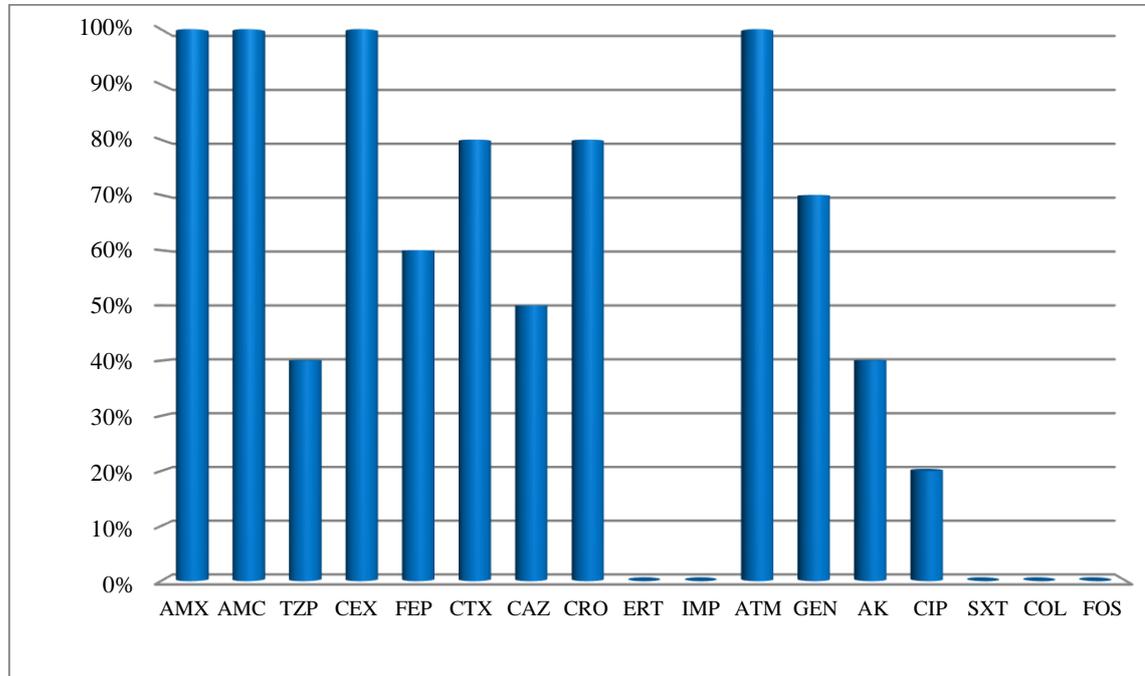
Figure 20 : Résistance aux antibiotiques de souches *Enterobacter sp.* multirésistantes isolées

Ces pourcentages sont élevés que ceux indiqués par le 16^{ème} rapport de l'AARN (35.76%) à la ciprofloxacine et (41.54%) au Triméthoprime/sulfaméthoxazole [195]. Ils sont nettement supérieurs par apport à ceux rapportés par Khennouchi *et al.* concernant les souches isolées à Marseille avec 14% de résistance à la ciprofloxacine et le Triméthoprime/sulfaméthoxazole [198].

Pour sa part, *Citrobacter sp.* montre des taux de résistance aux β -lactamines variant de 40% à 100%. A l'exception pour les carbapénèmes où aucune résistance n'a été détectée. Des études récentes en Inde et en Iran rapportent aussi des fréquences de résistance similaire vis-à-vis des β -lactamines [199,200]. Cependant, les résultats des niveaux de résistance révélés par Bouguenoun *et al.* [177] sont nettement inférieurs à ceux de la présente étude.

Par contre les souches exhibent une importante résistance aux aminosides avoisine de 70% vis-à-vis de la gentamicine. Elle est de 40% à l'amikacine : taux le plus élevé pour les entérobactéries de la présente étude. Contrairement à une étude nationale réalisée par Lagha *et al.* montrant une résistance totale vis-à-vis de la gentamicine et l'amikacine [190]. Ainsi à l'échelle internationale Mohan *et al.* énoncent aussi des taux très élevés de 73.3% et de 62% à la gentamicine et à l'amikacine respectivement [199].

Il ressort aussi que la ciprofloxacine n'est active qu'à 20% (Figure 21). Cependant aucune résistance n'a été détectée vis-à-vis de cet antibiotique dans l'étude menée par Mellouk *et al.* et Bouguenoun *et al.* [3,177].



AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, TZP : Pipéracilline+tazobactam, CEX : Céfalexine, FEP : Céfépime, CTX : Céfotaxime, CAZ : Ceftazidime, CRO : Ceftriaxone, ETP : Ertapénème, IMP : Imipénème, ATM : Aztreonam, GN : Gentamycine, AK : Amikacine, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Triméthoprim-sulfaméthoxazole, COL : Colistine, FOS : Fosfomycine.

Figure 21 : Résistance aux antibiotiques de souches *Citrobacter sp.* multirésistantes isolées.

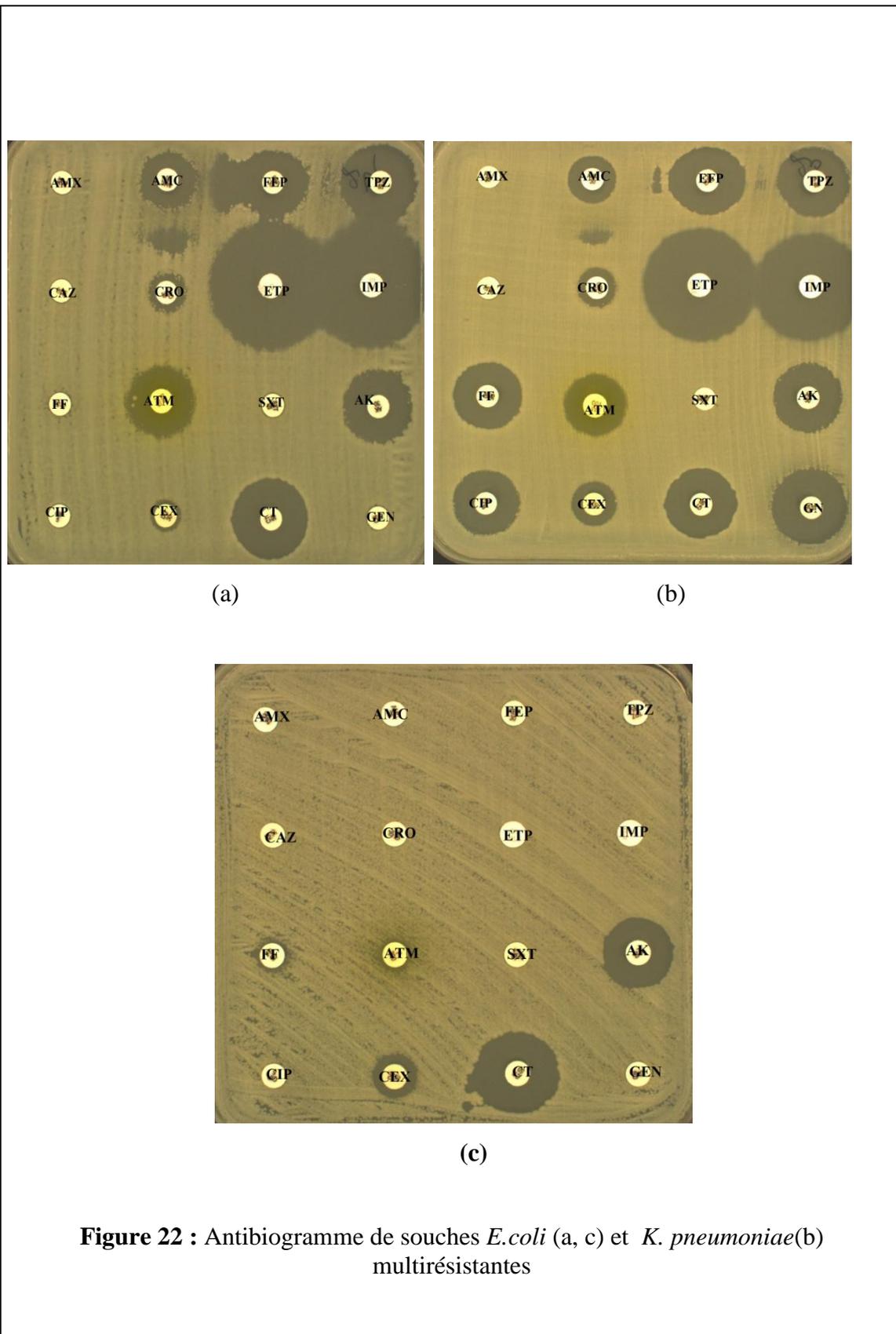


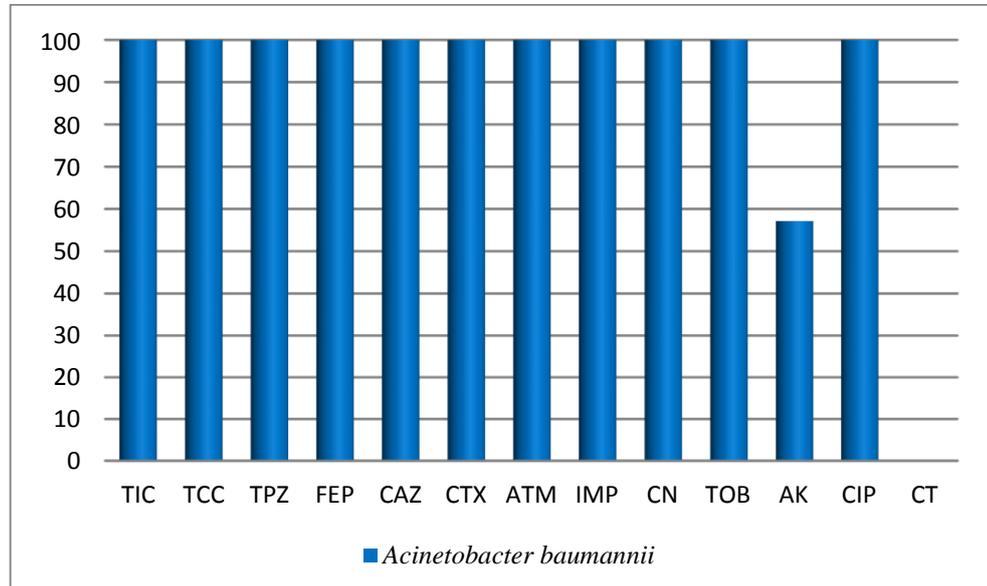
Figure 22 : Antibiogramme de souches *E.coli* (a, c) et *K. pneumoniae*(b) multirésistantes

3.2. Bacilles à Gram négatif non fermentaire retenus

A. baumannii et *P. aeruginosa* sont des agents pathogènes très incriminés dans les infections nosocomiales et qui s'adaptent facilement à l'environnement hospitaliers. En dehors de leurs résistances naturelles, ils sont capables d'acquérir une résistance à presque tous les antibiotiques actuellement utilisés, y compris les carbapénèmes. Ces derniers sont des antibiotiques de choix à usage hospitalier ayant une excellente activité vis-à-vis de bactéries multirésistantes [177].

Dans notre étude l'effet marquant est la totale résistance des BGN-NF à l'imipénème. Cela constitue un véritable problème qui ne peut être que le résultat d'une consommation excessive ou inadéquate de cet antibiotique. Les souches BGN-NF pouvant être propres à l'environnement des services, ayant résisté au processus de désinfections et stérilisations sont transmis aux malades.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches *A.baumannii* isolées se caractérise aussi par des taux de résistances de 100% pour les fluoroquinolones et les aminosides. Seule l'amikacine garde une activité à hauteur de 42.86 % (Figure 23).



TIC : Ticarcilline, **TCC** : Ticarcilline/ acide clavulanique, **TPZ** : Pipéracilline /tazobactam, **FEP** : Céfépime, **CAZ** : Ceftazidime, **CTX** : Cefotaxime, **ATM** : Aztreonam, **IMP** : Imipénème, **CN** : Gentamicine, **TOB** : Tobramycine, **AK** : Amikacine, **CIP** : Ciprofloxacine, **CT** : Colistine.

Figure 23 : Résistance aux antibiotiques d'*A.baumannii* multirésistantes isolées

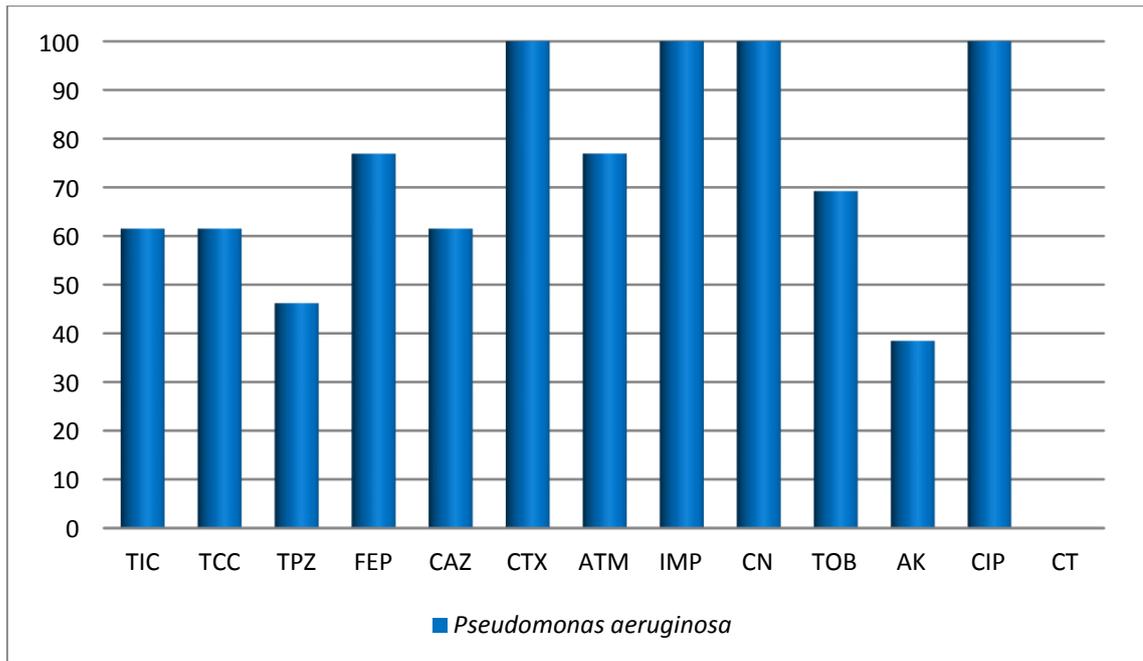
Ce profile de résistance est comparable à ceux retrouvés à Alger, Sétif et Bejaia par Bakour *et al.* et au Qatar par Rolain *et al.* qui tous rapportent que la majorité des souches d'*A.baumannii* isolées sont totalement résistantes à tous les antibiotiques testés, y compris l'imipénème [61, 201]. Situation qui a donc évolué sachant que des études antérieures [55, 3, 202] rapportent des taux relativement moins alarmants. De part les régions on décrit en Egypte un taux de résistance à l'imipénème de 70% [165], en Tunisie de 34.5% [55], en Italie de 76% [203], en France de 15.2% [55] et en Arabie Saoudite de 5.4% [165].

Comparativement, les souches de *P.aeruginosa* montrent des taux de résistances relativement inférieurs. Elle est de 61.5% à la ticarcilline, ticarcilline /acide clavulanique et à la ceftazidime, de 46.2% à la pipéracilline tazobactam et de 76.92% à la cefepime et à l'aztréonam. Résultats un peu plus élevés que ceux rapportés par Sefraoui *et al.* et par le 16^{ème} rapport de l'AARN [182,195].

Une résistance à l'imipénème est notée chez toutes les souches de *P. aeruginosa* mises en cause, résultats similaires à ceux rapportés de Guelma par Bouguenoun *et al.* [177]. Des travaux conduits au Liban par Al-Bayssari *et al.* disent les mêmes niveaux de résistance à cet antibiotique [204]. A Annaba mellouk *et al.* et à Oran Sefraoui *et al.* mais aussi le 16^{ème} rapport de l'AARN décrivent des niveaux moyens de résistance à l'imipénème ne dépasser pas les 50% chez *Pseudomonas aeruginosa* [3, 182,195].

Pour la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine le comportement est proche de celui des *Acinetobacter* avec des taux de résistance de 100%, 69.23% et de 38.46% respectivement. Résultats supérieurs à celui décrit par mellouk *et al.* et par le 16^{ème} rapport de l'AARN [3,195].

Vis-à-vis de fluoroquinolones la résistance à la ciprofloxacine atteint 100% (Figure 24). Dias *et al.* en 2017 parle aussi d'une résistance totale des souches de *P.aeruginosa* à cet antibiotique [205].



TIC : Ticarcilline, **TCC** : Ticarcilline/ acide clavulanique, **TPZ** : Pipéracilline /tazobactam, **FEP** : Céfépime, **CAZ** : Ceftazidime, **CTX** : Cefotaxime, **ATM** : Aztreonam, **IMP** : Imipénème, **CN** : Gentamicine, **TOB** : Tobramycine, **AK** : Amikacine, **CIP** : Ciprofloxacine, **CT** : Colistine.

Figure 24 : Résistance aux antibiotiques des *P.aeruginosa* multirésistantes isolées

La colistine reste l'antibiotique le plus efficace avec 100% sur les souches *A.baumannii* et *P.aeruginosa*.

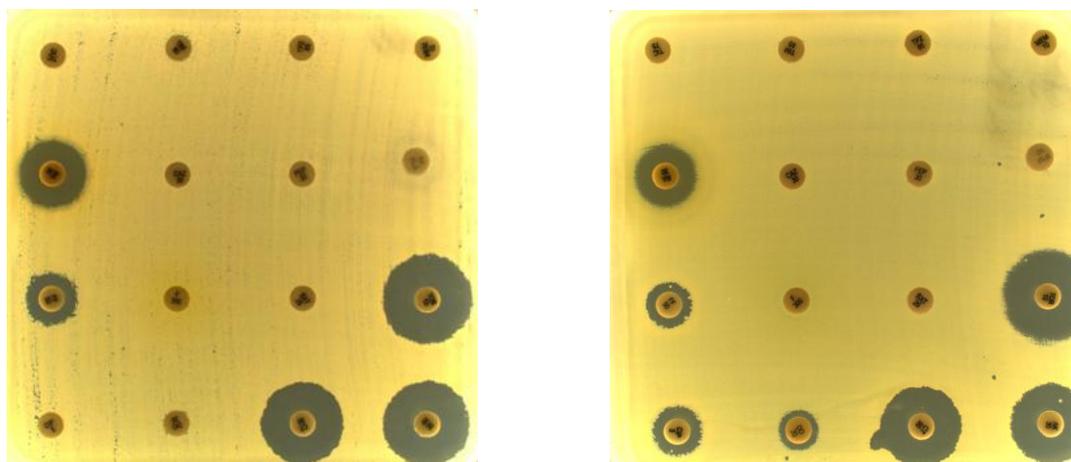


Figure 25 : Antibiogramme de souches *A. baumannii* multirésistantes

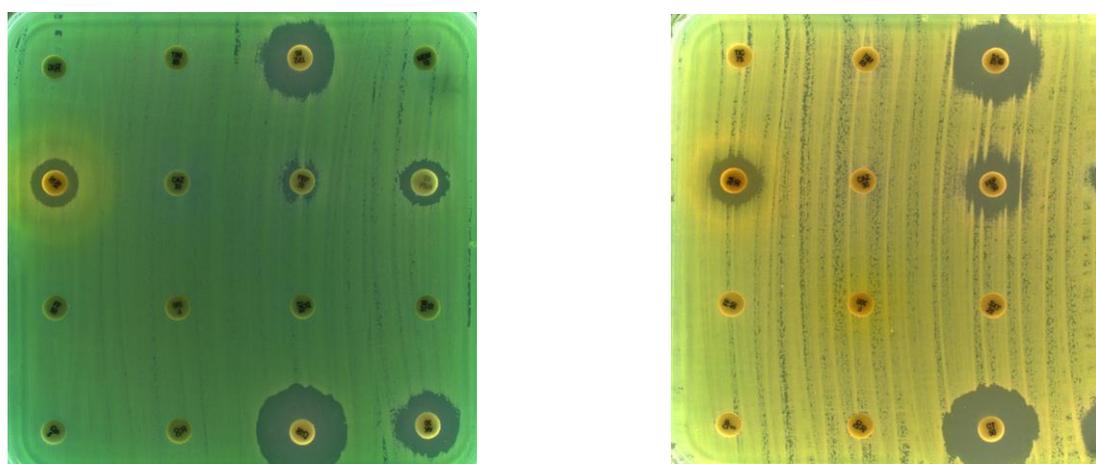


Figure 26 : Antibiogramme de souches *P.aeruginosa* multirésistantes

Une résistance élevée avérée des souches collectées BGN fermentaires aux céphalosporines et BGN-NF aux carbapénèmes. Cette résistance est le résultat d'élaboration d'enzymes types β -lactamases qui sont des enzymes les plus puissantes que les BGN ont pue produire. Ce qui doit attirer notre attention vue la limitation des choix thérapeutiques causé par ces résistances. Il devient alors impératif la détermination et la caractérisation phénotypique et génotypique de ces enzymes.

4. Caractérisation phénotypique et génotypique des β -lactamases

4.1. β -lactamases à spectre élargi chez *Enterobacteriaceae*

Les *Enterobacteriaceae* est l'une des familles bactériennes d'une grande importance dans le domaine médicale du fait de leurs incriminations dans la plupart des infections humaines aussi bien en milieu hospitalier que communautaire. La diversité des espèces de cette famille est accompagné toujours par une variété de comportements vis-à-vis des antibiotiques est par conséquent l'apparition d'une large diversité des mécanismes de résistance.

Chez les espèces de cette famille le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontrés est la sécrétion des β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces enzymes ayant la capacité d'hydrolyser les céphalosporines, les monobactames et les pénicillines. C'est-à-dire elles sont capables de conférer une résistance à la quasi-totalité des β -lactamines, excepté les céphamycines et les carbapénèmes d'où un risque majeur d'échecs thérapeutiques [188]. L'Algérie est considérée comme un pays à forte épidémie de BLSE où leur prévalence dépasse les 29 % selon le 16^{ème} rapport de l'AARN [195]. A ce jour, la situation est beaucoup plus alarmante rapportée par plusieurs études [3,165, 194,197, 198].

Le test de synergie, pratiquer à nos souches à permis de détecter de manière direct une BLSE chez environ le tiers (26/83) des entérobactéries retenues : 53.85 % *E.coli* (n= 14), 38.46 % *K. pneumoniae* (n= 10) et 7.69 % *E. cloacae* (n= 2). Ajouté à cela, la révélation de ce type d'enzyme par inhibition des céphalosporinases est détectée chez 8.43 % (n=7) des souches testées : 85.71 % *E.coli* (n= 6) et 14.29 % *K. pneumoniae* (n= 1) (Figure 27).

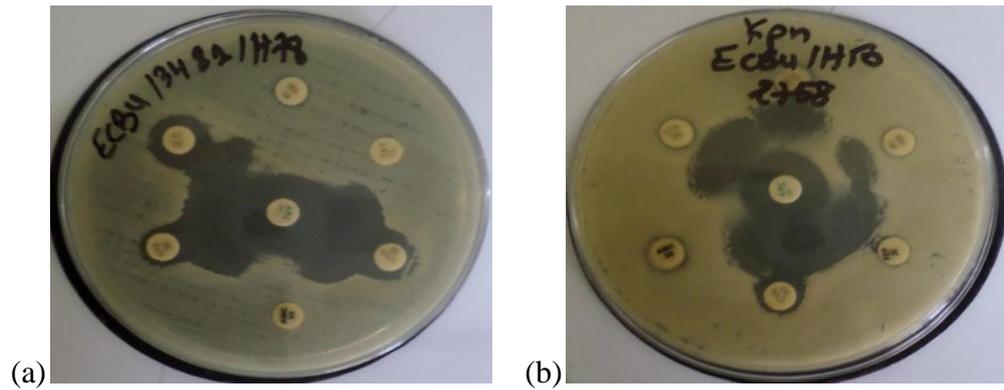


Figure 27 : Production de BLSE : (a) *E.coli* ; b) *K. pneumoniae*

A l'échelle nationale la fréquence de production de BLSE est variable. Parfois elle est basse de 11.47% à Annaba [165] et de 7.4% à Tlemcen [190] tantôt élevée voisine de 31.4% à Annaba [190] et de 39.22% à Tlemcen [190]. Elle est nettement inférieure aux résultats rapportés de Tunisie (66.6%) [197] et du Burkina Faso (58%) [165]. En Europe, à l'instar de plusieurs pays du monde [206]. beaucoup de travaux évoquent des taux très importants surtout en milieu hospitalier [206].

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces variations: les facteurs liés à la consommation quantitative et qualitative des antibiotiques notamment les C3G. Mais aussi la surcharge des hôpitaux ce qui entraîne des taux élevés de colonisation et d'infection. Ce dernier facteur est très important car les souches de *K. pneumoniae* présentent une aptitude particulière à acquérir des plasmides déterminants la production de BLSE. Dans notre pays l'utilisation du céfotaxime et, récemment de la ceftazidime pourrait en partie expliquer ce pourcentage élevé de BLSE. Par ailleurs la mauvaise utilisation des agents antimicrobiens, l'automédication et l'accès sans ordonnance aux antibiotiques constituent aussi des facteurs non négligeables dans l'apparition de BLSE. Le leadership de production de BLSE est partagé entre *E.coli* et *Klebsiella* [197]

La détermination moléculaire des supports génétiques codant pour la production de ces BLSE par PCR chez les 33 souches d'entérobactéries a révélé la dominance du gène *bla_{CTX-M}*. On le retrouve chez 51.51% des souches dont 76.47% sont des *E.coli* (n=13) et 23.53% sont des *K.pneumoniae* (n=4) (Tableau 19).

Tableau 19 : Caractérisation génotypique des entérobactéries productrices de BLSE

Souche	N°	Service	Sexe/ Age	prélèvement	PCR	
					Type de BLSE	
<i>E.coli</i>	1	Urologie	M/57	Urine	CTX-M	
	4	Urologie	F/53	Urine	CTX-M	
	5	Urologie	M/37	Urine	CTX-M	
	7	Urologie	M/54	Urine	CTX-M	
	10	Urologie	M/74	Urine	CTX-M	
	13	Anesthésie-réanimation	F/6	Urine	CTX-M	
	14	Endocrinologie	F/35	PV	CTX-M	
	16	Anesthésie-réanimation	M/42	ER	CTX-M	
	23	Endocrinologie	F/53	Urine	CTX-M	
	24	Brulés	F/ 64	Pus	CTX-M	
	25	Urologie	M/51	Urine	CTX-M	
	29	Brulés	F/68	Pus	CTX-M	
	32	Brulés	F/45	Pus	CTX-M	
	3	Urologie	F/23	Urine	TEM	
	17	Anesthésie-réanimation	F/29	ER	TEM	
	<i>K. pneumoniae</i>	20	Anesthésie-réanimation	M/40	PPD	TEM
		22	Urologie	M/61	Urine	TEM
27		Urologie	F/31	Urine	SHV	
28		Anesthésie-réanimation	M/35	ER	SHV	
30		Urologie	F/10	Urine	SHV	
6		Urologie	F/51	Urine	CTX-M	
7		Urologie	M/66	Urine	CTX-M	
10		Urologie	F/50	Urine	CTX-M	
12		Urologie	M /45	Urine	CTX-M	
21		Endocrinologie	F/69	Pus	TEM	
22		Brulés	M/36	Pus	TEM	
23		Endocrinologie	M/67	Pus	SHV	
24		Brulés	F/32	Pus	SHV	
25	Urologie	M/41	Urine	SHV		
27	Urologie	M/47	Pus	SHV		
29	Brulés	F/52	Pus	SHV		
<i>E.cloacae</i>	10	Urologie	F/34	Urine	TEM	
	7	Urologie	M/54	Pus	TEM	

Ce gène est décrit initialement en 1986 au Japon, Allemagne et France puis a connu une dissémination mondiale extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie CTX-M» chez différentes espèces d'entérobactéries. Les enzymes produites par ce gène ont communément une activité préférentielle sur le céfotaxime et la ceftriaxone par rapport à la ceftazidime. Actuellement plus de 150 variants CTX-M ont été décrits et répartis en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1, M-2, M-8, M-9, M-25 et M-45 en fonction des similitudes de leurs séquences en acides aminés [3, 188].

A l'échelle nationale plusieurs études antérieures ont rapportés que le gène *bla_{CTX-M}* est le plus répandue aussi bien en milieu hospitalier que communautaire avec la prédominance des variants *bla_{CTX-M-3}* et *bla_{CTX-M-15}* [188].

On retrouve aussi le gène *bla_{TEM}* chez 24.24% des souches : la moitié sont des *E. coli* (n= 4), 25% des *K. pneumoniae* (n= 2) et 25% des *E. cloacae* (n= 2) (Tableau19).

La première β -lactamase plasmidique de type Temoneira (TEM-1) est isolée en 1965 en Grèce, à partir d'une souche *E.coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira [3]. En Europe, les BLSE les plus fréquents sont les variants TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *Klebsiella pneumoniae* et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E.coli* [3]. A noter que la majorité des BLSE de ce type dérivent des mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G mais les rend plus vulnérable à l'action des inhibiteurs comme l'acide clavulanique. Par contre, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs appelées TRI (TEM Résistantes aux Inhibiteurs) [190].

En Algérie, cette enzyme est décrite dans plusieurs études chez différentes espèces. Bouguenoun *et al.* révèlent la présence de variant TEM-141 chez une souche *E. cloacae* et une souche de *K. pneumoniae* et le TEM-198 chez trois souches d'*E. cloacae* [177]. Ainsi Kermas *et al.* décrivent la présence de TEM-4 chez trois souches de *Salmonella enterica* [177].

En dehors des deux gènes su-cités nous avons révélé aussi la présence de gène *bla_{SHV}* chez plus de 24% des souches. Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène de pénicillinase chromosomique transposé sur un plasmide. Sa première détection était en Allemagne en 1980 chez une souche de *K. pneumoniae* [3]. Actuellement, plus de 180 variantes SHV ont été décrits. En Algérie, divers types de BLSE SHV ont été rencontrés chez différentes espèces tel que *K.pneumoniae*, *E.cloacae* et *E. coli*. Parmi eux SHV-12 est le plus fréquemment rapporté [188].

Dans le présent travail SHV est présent surtout chez *K.pneumoniae* 62.5% (n=5) et chez 37.5% *E. coli* (n=3) (Tableau19).

Les gènes codant pour ces enzymes sont généralement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons) ce qui expliquant la rapidité de leur propagation dans différents parties du monde et les risques d'apparition d'épidémies. Ajouter à cela, ces gènes sont retrouvés fréquemment sur les mêmes plasmides que les gènes qui codent pour la résistance aux aminosides, aux quinolones et aux sulfamides [188]. Cela signifie que leur présence chez les *Enterobacteriaceae* constitue un indice majeur de multirésistance. Se pose alors un défi particulier pour le traitement des infections causées par ces bactéries, en particulier chez les patients gravement malades.

Pour réduire le taux d'incidence des souches productrices de BLSE, plusieurs auteurs préconisent la restriction d'utilisation des C3G. Cette restriction est comblée par une augmentation de l'utilisation des carbapénèmes; molécules de dernier recours efficaces pour traiter les infections à entérobactéries productrices de BLSE. Ce qui pourrait favoriser l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes [3].

L'émergence et la dissémination d'entérobactéries productrices de carbapénémases est en continuelle augmentation dans différentes régions du monde surtout en Europe du Sud, le bassin méditerranéen en général et en Asie. Ce qui représente une menace importante notamment lorsqu'il s'agit infections nosocomiales [188].

En Algérie, en 2010, Robin *et al.* rapportent la première carbapénémase de type VIM-19 chez cinq souches d'entérobactéries : une *E. coli*, deux *K. pneumoniae*, et deux *Providencia stuartii* [3]. La même année Vaux *et al.* décrivent pour la première fois un autre type de carbapénémases (KPC) chez les entérobactéries [3]. Ensuite en 2014, Sassi *et al.* révèlent le premier cas autochtone des infections causées par *E.coli* productrice NDM-5 (New Delhi metalloβ-lactamase) isolée chez trois patients de la ville d'Annaba [3]. Puis en 2015, Bakour *et al.* mettent en évidence un autre type de carbapénémase nommé KPC-3 chez *Klebsiella pneumoniae* isolée chez un patient de Sétif [3].

La carbapénémase type OXA-48 semble être endémique en Algérie. Elle est identifiée pour la première fois en 2010 chez des entérobactéries [3]. Ensuite à Constantine en 2014 chez *E.coli*, souche isolée à partir d'un patient provenant de Tébessa [3], puis à Alger chez *K. pneumoniae* [3]. Mais aussi à Guelma, Annaba et Skikda en 2016 chez des souches de *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* [3,177].

Dans notre étude seule deux souches d'entérobactéries sont résistantes aux carbapénèmes: une souche d'*E.coli* N° 9 et une souche de *K. pneumoniae* N° 2. La recherche de la production de carbapénémase par test d'Hodge révèle la présence de cette enzyme uniquement chez *E.coli*. Alors que la souche de *K. pneumoniae* est apparue négative à ce test. Cela signifie que la résistances des entérobactéries aux carbapénèmes n'est pas limitée à la production de carbapénémases, mais peut impliquer d'autres mécanismes, y compris des changements structurels dans la membrane externe et/ou l'hyperproduction d'AmpC en plus des BLSE [177].

4.2. Carbapénémases chez les BGN-NF

La résistance des bacilles à Gram négatif non fermentant, notamment *A.baumannii* et *P. aeruginosa* aux β -lactamines, pose un véritable problème épidémique. Ils deviennent très inquiétants lorsqu'ils montrent une multirésistance associée à la production de carbapénémases rendant les souches pratiquement pana-résistantes (résistantes à toutes les antibiotiques). Tous cela mène à une réduction de possibilités antibio-thérapeutique, une augmentation des coûts de soins et à un taux de mortalité élevé [207].

Parmi les 60 souches de BGN-NF résistantes à l'imipénème de la présente étude, seule 33 (21 *A.baumannii* et 12 *P.aeruginosa*) se sont révélées positives au test d'Hodge modifié. Ce qui indique que ces souches sont productrices de carbapénémases (Figure 28).

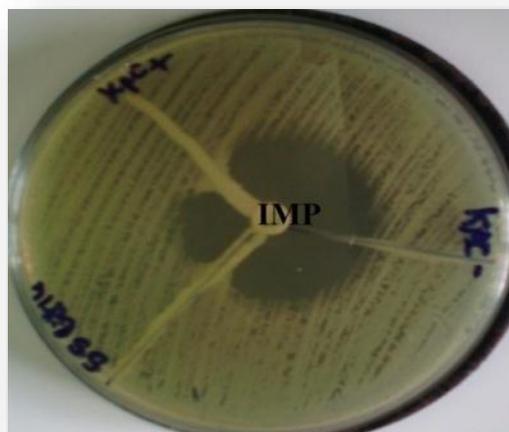


Figure 28 : Test d'Hodge modifié positive d'une souche *A.baumannii*

Par ailleurs, 15 entre elles (3 *A.baumannii* et 12 *P.aeruginosa*) ont une carbapénèmase de type métallo- β -lactamase détectée par le test combiné IMP-EDTA (Tableau 20 et 21).

Tableau 20 : Caractérisation phénotypique et génotypique d'*A.baumannii*-RC

Souche	Service	Sexe/ Age	Prélèvement	Tests phénotypique		PCR Carbapénèmases
				MHT	EDTA	
1	Brulés	H/52	Pus	+	-	OXA-23
2	Endocrinologie	H/62	Pus	+	-	OXA-23
3	Endocrinologie	H/71	Pus	+	-	OXA-23
4	Endocrinologie	H/70	Pus	+	-	OXA-23
5	Endocrinologie	H/50	Pus	+	-	OXA-24
6	Urologie	F/38	Urine	+	-	OXA-24
7	Endocrinologie	F/34	Pus	+	+	NDM-1
8	Endocrinologie	H/36	Pus	+	-	OXA-23
9	Urologie	H/41	Urine	+	-	OXA-24
10	Endocrinologie	F/41	Pus	+	-	OXA-23
11	Urologie	H/48	Urine	+	-	OXA-23
12	brulés	H/69	Pus	+	-	OXA-24
13	Endocrinologie	H/49	Pus	+	-	OXA-23
14	Urologie	F/52	Urine	+	+	NDM-1
15	Brulés	F/33	Pus	+	-	OXA-23
16	Urologie	F/29	Urine	+	-	OXA-23
17	Endocrinologie	H/84	Pus	+	-	OXA-23
18	Endocrinologie	H/63	Pus	+	-	OXA-24
19	Urologie	H/36	Urine	+	-	OXA-23
20	Endocrinologie	H/55	Pus	+	-	OXA-24
21	Urologie	F/74	Urine	+	+	NDM-1

Tableau 21: Caractérisation phénotypique et génotypique de *P.aeruginosa*-RC

Souche	Service	Sexe/ Age	prélèvement	Tests		PCR
				MHT	EDTA	Carbapénèmases
1	brulés	F/68	Pus	-	-	-
2	brulés	F/39	Pus	-	-	-
3	brulés	H/29	Pus	-	-	-
4	brulés	H/40	Pus	-	-	-
5	brulés	H/46	Pus	-	-	VIM-2
6	brulés	H/17	Pus	-	-	-
7	brulés	H/49	Pus	+	+	VIM-2
8	brulés	H/20	Pus	-	-	-
9	Urologie	H/25	Urine	+	+	VIM-2
10	Urologie	F/18	Urine	-	-	-
11	Urologie	F/23	Urine	+	+	VIM-2
12	brulés	F/50	Pus	-	-	-
13	Endocrinologie	H/55	Pus	-	-	-
14	Brulés	H/72	Pus	+	+	VIM-2
15	Brulés	F/58	Pus	-	-	-
16	Anesthésie- réanimation	F/45	PPD	-	-	-
17	Endocrinologie	H/59	Pus	-	-	-
18	Brulés	H/41	Pus	-	-	-
19	Urologie	H/78	Urine	+	+	VIM-2
20	Brulés	F/21	Pus	-	-	-
21	Brulés	H/19	Pus	-	-	-
22	Anesthésie- réanimation	H/33	PPD	+	+	VIM-2
23	Brulés	H/26	Pus	-	-	-
24	Brulés	H/43	Pus	-	-	-
25	Urologie	H/76	Urine	+	+	VIM-2
26	Brulés	H/47	Pus	-	-	-
27	Anesthésie- réanimation	H/58	PPD	-	-	-
28	Brulés	F/36	Pus	-	-	-
29	Endocrinologie	H/66	Pus	+	+	VIM-2
30	Brulés	F/48	Pus	-	-	-
31	Anesthésie- réanimation	F/57	PPD	-	-	-
32	brulés	H/51	Pus	-	-	-
33	brulés	H/63	Pus	+	+	VIM-2
34	Brulés	F/42	Pus	-	-	-
35	Urologie	H/53	Urine	-	-	-
36	Brulés	H/57	Pus	+	+	VIM-2
37	Anesthésie- réanimation	H/44	PPD	-	-	-
38	Anesthésie- réanimation	H/35	PPD	+	+	VIM-2
39	Brulés	F/38	Pus	-	-	-

La large diffusion des souches BGN-NF productrices de carbapénèmases constitue une menace pour la santé publique mondiale. La caractérisation moléculaire des mécanismes et l'épidémiologie de la multirésistance est une étape principale pour lutter contre sa propagation et de développer des approches thérapeutiques adaptés [3].

Chez *A.baumannii* la résistance aux carbapénèmes est généralement due à la production de carbapénèmases en particulier de type OXA (classe D). Ces dernières sont codées par des gènes localisés soit sur le chromosome comme le *bla_{OXA-51}* qui ne s'exprime que lorsque l'élément de séquence d'insertion IS_{Aba1} est inséré en amont du gène. Il peut aussi être localisé sur des plasmides comme *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}* et *bla_{OXA-58}*. Ces dernières années, l'émergence et la propagation de ce type de carbapénémase ont été signalées dans plusieurs hôpitaux algériens [188]. Plusieurs études décrivant la présence de ces gènes chez des souches d'*A.baumannii* isolés dans différents endroits en Algérie aussi bien à partir de prélèvements pathologique ou de l'environnement hospitalier : *bla_{OXA-23}* et *bla_{OXA-58}* à Annaba [59], *bla_{OXA-24}* et *bla_{OXA-72}* à Sétif [59], *bla_{OXA-23}* à Tizi-Ouzou [59], et *bla_{OXA-23}* et *bla_{OXA-24}* à Tlemcen et Oran [59], *bla_{OXA-23}* à Guelma et Skikda [3,177].Le gène *bla_{OXA-23}* est le plus répandu chez cette espèce et semble être endémique en Algérie [188].

Nous avons détecté le gène *bla_{OXA-23}* dans la plupart des souches *A.baumannii* productrices de carbapénèmases (57.14% ; n=12) et le gène *bla_{OXA-24}* dans 28.57% des souches (n=6) (Tableau 20).

Ainsi, la résistance aux carbapénèmes chez *A.baumannii* peut être aussi médiée par production des métallo-β-lactamases (classe B) [188]. Les enzymes MBLs décrites chez *A. baumannii* sont : IMP, VIM, SIM, et NDM. Parmi eux le variant NDM-1 est le plus rependu chez cette espèce dans le monde entier [59]. Ce dernier à été identifié pour la première fois dans *K. pneumoniae* et *E. coli*, puis dans *A.baumannii* en Inde [188]. Ensuite cette enzyme a connue une diffusion mondiale en Allemagne, Belgique, Bangladesh, Chine, en République tchèque, Israël et en Egypte etc.... [188].

En Algérie, Le premier métallo-β-lactamases type NDM-1 est identifié chez des souches *A. baumannii* isolées à partir des patients algériens transférés en France et en Belgique. Puis, cette enzyme est rapportée dans l'ouest d'Algérie, à Sétif et à Alger.

Récemment et pour la première fois ce gène est détecté chez des isolats d'*Acinetobacter nosocomialis* à Ouargla [165].

Dans la présente étude le gène *bla_{NDM-1}* est détecté chez trois isolats d'*A.baumannii* (Tableau 20).

P.aeruginosa est connue pour avoir divers types de Metallo-β-lactamases (MBL) dans différentes régions du monde entre autre l'IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, FIM et NDM. Les Métallo-β-lactamases de type VIM, notamment VIM-2 est le plus rapporté surtout dans le bassin méditerranéenne incluant les pays européens : l'Italie, la France, la Grèce, l'Espagne, la Croatie et la Turquie. Mais aussi décrit dans les pays africains: la Tunisie, Libye, Egypte, Kenya et l'Afrique du Sud [208].

En Algérie, la première détection du gène *bla_{VIM-2}* dans *P.aeruginosa* faite par Touati *et al.* et Toumi *et al.* à Annaba, puis par Sefraoui *et al.* à Oran. Récemment, le gène *bla_{VIM-4}* à été décrit pour la première fois à Annaba et Skikda par mellouk *et al.* et Meradji *et al.* dans des souches de *P.aeruginosa* [165].

Nous rapportons dans cette étude le gène *bla_{VIM-2}* chez 12 souches de *P.aeruginosa* isolées essentiellement des prélèvements de pus issus des services des grands brûlés aux CHU d'Annaba- Algérie (Tableau 21).

Pour les 27 souches de *P.aeruginosa* non productrices de carbapénèmases la résistance à l'imipénème peut être expliquée par deux choses. Soit c'est inactivation mutationnelle du gène *oprD* principal déterminant de la résistance aux carbapénèmes, en particulier à l'imipénème, comme décrit précédemment dans de nombreuses études ou encore par le phénomène de l'efflux [182].

5. Activité d'associations à base de colistine sur BGN multirésistants

5.1. *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases

La multirésistance des BGN constitue l'une des questions épineuses que les praticiens tentent de résoudre pour outre passer les échecs thérapeutiques. Cette multirésistance touche essentiellement les antibiotiques de la famille β -lactamines. Cependant les supports responsables de cette situation sont le plus souvent portés par des éléments mobiles et, en plus situés à proximité d'autres gènes de résistance aux aminosides ou aux quinolones. Il en résulte une multirésistance que l'une des solutions clés est l'utilisation d'associations d'antibiotiques à activités de type synergique.

La recherche et la caractérisation de type d'associations à base de colistine passe obligatoirement par la détermination de la concentration minimale inhibitrice de chaque antibiotique séparément. Les résultats nous permettent de définir les valeurs des CMI sub-inhibitrices réduisant ainsi le coût et la toxicité

5.1.1. CMI de la colistine sur les *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases

Toutes les souches entérobactériennes productrices de BLSE (n=33) et les deux souches résistantes aux carbapénèmes sont sensibles à la colistine avec des valeurs de CMI relativement faible allant de 0.125 à 1 $\mu\text{g/ml}$. C'est un intervalle étroit et la CMI modale relative à ces souches est de 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Cette concentration est observée chez 14 souches, dont dix souches *E.coli*, trois *K. pneumoniae* et une *E. cloacae*. Ces souches sont isolées principalement des urines et de pus. La CMI la plus élevée est de 1 $\mu\text{g/ml}$ retrouvée chez trois *E.coli* et deux *K. pneumoniae*. Par ailleurs la CMI la plus faible de la colistine est de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ retrouvée chez deux *E.coli*, une *K. pneumoniae* et une *E. cloacae* (Tableau 22).

Depuis la situation a évolué malheureusement dans le mauvais sens. Une revue de littérature réalisée par Touati *et al.* sur la résistance à la colistine dans les pays d'Afrique du Nord montre que la CMI de la colistine chez les souches de la famille *Enterobacteriaceae* variait de 2 à 32 $\mu\text{g/ml}$ [125]. Cependant, il est important d'attirer l'attention sur le fait que certaines souches possèdent le gène *mcr* responsable de la résistance à la colistine ont des CMI $< 2 \mu\text{g/ml}$ et sont classées comme souches sensibles. Ainsi, de nombreuses souches produisant du *mcr-9* ont été signalées par de nombreux auteurs comme sensibles à la colistine avec une CMI égale à 0.25 $\mu\text{g/ml}$ et

ces souches pourraient se disséminer silencieusement parmi les souches entérobactéries [125]. C'est le cas de plusieurs de nos souches ayant des CMI les classant parmi les sensibles alors qu'elles peuvent être porteuses de gènes de résistances *mcr* pouvant s'exprimer quand les conditions sont réunies.

Tableau 22: CMI de la colistine, l'imipénème, l'amikacine et la ciprofloxacine des *Enterobacteriaceae* testées

Souches	N°	CMI µg/ml			
		COL	IMP	AK	CIP
<i>E. coli</i>	1	0.25	1	8	8
	4	1	1	32	16
	5	0.5	0.5	8	8
	7	0.5	0.25	8	0.25
	10	0.125	0.5	16	32
	13	0.25	0.5	32	16
	14	0.25	1	16	16
	16	1	0.5	8	64
	23	0.5	0.5	16	8
	24	0.25	0.5	64	32
	25	0.25	0.5	8	128
	29	0.5	1	16	32
	32	0.5	0.25	32	8
	3	0.125	0.5	8	16
	17	0.5	1	4	8
	20	1	0.5	16	8
	22	0.25	0.25	2	64
	27	0.25	1	16	4
	28	0.25	0.5	4	32
	30	0.25	1	8	16
<i>K. pneumoniae</i>	9	0.25	16	4	8
	6	0.5	0.5	64	64
	7	0.25	1	8	4
	10	0.5	0.5	16	16
	12	1	0.25	8	8
	21	0.5	0.25	32	32
	22	0.125	1	64	8
	23	0.25	1	16	0.25
	24	0.5	0.5	32	4
	25	0.25	1	2	8
	27	0.5	0.5	4	16
	29	1	0.25	16	0.25
<i>E. cloacae</i>	2	0.5	1	8	8
	10	0.125	0.25	32	8
	7	0.25	0.5	64	4

5.1.2. CMI de l'imipénème sur les *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases

Parmi les souches testées seule une *E.coli* isolée de pus d'un homme diabétique de 61 ans est résistante à l'imipénème avec une CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$. Le reste des souches est sensible avec des valeurs de CMI variant de 0.25 à 1 $\mu\text{g/ml}$, ou la limite supérieure est à un « pas » de la résistance. La CMI modale de ces souches est de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Cette dernière est notée chez 15 souches, dont dix *E.coli*, quatre *K. pneumoniae* et une *E. cloacae*. Ces souches sont isolées essentiellement des urines et de pus. La CMI la plus élevée 1 $\mu\text{g/ml}$ est observée chez sept souches *E. coli* et cinq *K. pneumoniae*. Par ailleurs trois souches *E.coli*, trois *K. pneumoniae* et une *E. cloacae* exhibent des CMI faible de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 22). Actuellement, plusieurs études rapportent des valeurs de CMI élevées à l'imipénème. En effet, Aggoune *et al.* parlent de valeur de CMI > 32 vis-à-vis de l'imipénème d'une souche de *K. pneumoniae* isolé à partir d'un bébé de 18 mois hospitaliser en pédiatrie [209]. Belbel *et al.* révèlent aussi des souches de *K. pneumoniae* résistantes à l'imipénème avec des CMI allant de 3 à 4 $\mu\text{g/ml}$ isolées essentiellement des urines et de pus [37].

5.1.3. CMI de l'amikacine sur les *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases

Une des molécules qui montre une activité certaine sur les souches collectées est l'Amikacine. La résistance à cet antibiotique est apparue seulement chez dix souches entérobactéries isolées notamment de pus et d'urine. La valeur absolue des CMI de cet antibiotique varient dans un intervalle très réduit allant de 32 à 64 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 22).

Le reste des souches (n=25) est sensible avec des CMI oscillant de 2 à 16 $\mu\text{g/ml}$. La CMI modale de ces souches est de 8 $\mu\text{g/ml}$ représenté par sept *E.coli* et trois *K. pneumoniae*. Dix neuf souches possèdent une CMI supérieure ou égale à la CMI modale. Dans ce cas la population apparemment sensible laisse apparaître une tendance claire vers la résistance. Cela se distingue aussi par une limite supérieure voisine de la limite de résistance portée par six *E.coli* et trois *K. pneumoniae*. (Tableau 22).

5.1.4. CMI de la ciprofloxacine sur les *Enterobacteriaceae* productrices de β -lactamases

A l'inverse de l'amikacine, la majorité des souches testées (n=32) est résistante à la ciprofloxacine et avec des CMI très élevées variant de 4 à 128 $\mu\text{g/ml}$. C'est un intervalle large et la CMI modale relative à ces souches est de 8 $\mu\text{g/ml}$. Cette concentration est enregistrée chez sept souches *E.coli*, quatre *K. pneumoniae* et une *E. cloacae*. Ces souches sont isolées principalement des urines et de pus. Parmi elles, une *E.coli*, deux *K. pneumoniae* et une *E. cloacae* arborent des valeurs égales à la limite inférieure. Alors que seule une souche *E.coli* isolée d'urine d'un homme de 51 ans est résistante jusqu'à 128 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacine. L'activité de la ciprofloxacine est préservée sur une souche d'*E.coli* et deux *K. pneumoniae* pour les quelles la CMI est de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 22).

5. 2. BGN-NF producteurs de carbapénèmases

5.2.1. CMI de la colistine sur les BGN-NF producteurs de carbapénèmases

Tous les isolats d'*A. baumannii* (n=21) sont sensibles à la colistine avec des valeurs de CMI oscillant de 0.25 à 2 $\mu\text{g/ml}$ (Figure). Ces souches ont une CMI modale de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 23). Leur répartition selon la valeur de la CMI laisse apparaître une distribution de la majorité (15/21) des souches au delà du domaine de la CMI modale. C'est une tendance claire vers la résistance

Bakour *et al.* décrivent une situation semblable chez des souches *A. baumannii* de différente origine ayant des CMI entre 0.047 à 0.125 $\mu\text{g/ml}$ [59]. Par contre Kieffer *et al.* montrent des valeurs de CMI sur 28 souches d'*A.baumannii* oscillant dans un intervalle très vaste de 0.125 à 128 $\mu\text{g/ml}$ [210].

Tableau 23: CMI de la colistine, l'imipénème, l'amikacine et la ciprofloxacine des souches *A.baumannii* testées

Souches	CMI µg/ml			
	COL	IMP	AK	CIP
1	1	32	32	64
2	2	32	8	16
3	1	64	32	128
4	1	32	64	32
5	0.25	32	64	64
6	2	32	8	32
7	0.5	32	64	16
8	0.25	32	8	32
9	2	64	64	16
10	1	32	8	128
11	2	32	8	32
12	1	16	32	64
13	1	32	8	32
14	0.25	32	64	16
15	2	32	8	64
16	1	32	32	128
17	2	16	8	16
18	0.5	32	8	64
19	1	16	32	32
20	0.5	64	32	64
21	1	32	64	16

Concernant les souches de *P.aeruginosa* une résistance intermédiaire à la colistine est détecté chez 12 souches avec des CMI égale à 4 µg / ml. Les souches restantes (n=27) sont sensible à la colistine est les valeurs de CMI varient de 1 à 2 µg / ml. La CMI modale de ces souches est de 1 µg / ml (Figure 34) (Tableau 24).

Tableau 24: CMI de la colistine, l'imipénème, l'amikacine et la ciprofloxacine des souches de *P.aeruginosa* testées

Souches	CMI µg/ml			
	COL	IMP	AK	CIP
1	4	16	32	8
2	2	32	8	64
3	4	16	8	64
4	4	32	8	64
5	4	128	32	32
6	2	16	32	128
7	1	64	8	64
8	1	16	8	16
9	1	64	32	32
10	2	32	16	64
11	2	64	4	128
12	1	32	32	64
13	1	16	16	32
14	4	64	8	64
15	2	16	32	8
16	1	32	8	128
17	4	128	32	64
18	2	16	8	32
19	1	64	8	64
20	4	32	16	64
21	1	16	8	32
22	2	32	8	64
23	1	16	32	64
24	4	64	8	128
25	2	16	32	64
26	1	32	8	32
27	4	128	32	16
28	2	32	4	64
29	4	64	32	8
30	1	16	8	64
31	4	32	32	32
32	2	16	16	128
33	1	64	32	16
34	2	16	8	64
35	1	32	32	32
36	4	16	16	64
37	2	64	4	128
38	1	32	16	64
39	1	16	32	32

5.2.2. CMI de l'imipénème sur les BGN-NF producteurs de carbapénémases

Les BGN-NF sont connus par leur résistance naturelle aux antibiotiques et, l'acquisition de la résistance à l'imipénème fait de ces souches des bactéries non seulement multirésistantes mais aussi hautement résistantes.

Les valeurs absolues des CMI de l'imipénème vis-à-vis de 21 souches *A.baumannii* obtenus aussi bien par méthode de microdilution que par E-test sont assez élevées allant de 16 à 64 µg/ml. Souches isolées pour la majorité de pus ayant une CMI modale de 32 µg/ml (Tableau 23). La situation est donc très préoccupante et des mesures adaptées doivent être mises en route dans les meilleurs délais.

Cette situation ne date pas d'aujourd'hui, et des études antérieures montrent aussi des niveaux très élevés de résistance des souches d'*A.baumannii* à l'imipénème, ou les valeurs de CMI allant de 8 à 2048 µg/ml [55, 194, 202]. Ce sont des larges intervalles de résistance à l'imipénème ce qui explique que la résistance à cet antibiotique est en continuelle augmentation avec des valeurs de CMI alarmante.

L'image qui se dessine avec les 39 souches de *P.aeruginosa* n'est pas meilleure. En effet les valeurs absolues de CMI de l'imipénème obtenues par méthode de microdilution que par E-test varient dans un intervalle plus large de 16 à 128 µg/ml. Ce sont des niveaux très élevés de résistance ou la CMI modale est de 16 µg/ml. Au-delà de tout cela trois souches isolées de pus ont une CMI égale à 128 µg/ml (Tableau 24).

Des valeurs similaires ont été rapportées par Safraoui *et al.* [208], de même que Touati *et al.* [55]. Ces travaux parlent de CMI de plus de 8 µg/ml pouvant atteindre jusqu'à 128 µg/ml.

5.2.3. CMI de l'amikacine sur les BGN-NF producteurs de carbapénémases

Pour l'amikacine, la résistance est apparue chez 12 souches d'*A.baumannii* et les valeurs des CMI sont de 32 µg/ml ou 64 µg/ml. Par contre, l'activité de cette antibiotique est conservée sur neuf souches d'*A.baumannii* avec des CMI égales à 8 µg/ml (Tableau 23). Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées par

Bakour *et al.* [61] ainsi que l'équipe d'Al-Agamy [211] en Egypte qui décrivent des niveaux de résistance très élevées de 32 à >256 µg/ml.

Chez les 39 souches de *P.aeruginosa* la situation est différente ou l'activité de l'amikacine est préservée sur la majorité des souches (n=24) avec des CMI allant de 4 à 16 µg/ml. Parmi elles 21 souches ont une CMI supérieure ou égale à la CMI modale 8 µg/ml. Dans ce cas la population apparemment sensible laisse apparaître une tendance claire vers la résistance. Le reste des souches (n=15) est apparemment résistantes avec des valeurs de CMI égale à 32 µg/ml (Tableau 24). Ces résultats est similaires à celles rapportées par Lin *et al.* qui révèlent aussi des CMI entre 32 à 64 µg/ml [212].

5.2.4. CMI de la ciprofloxacine sur les BGN-NF producteurs de carbapénémases

L'ensemble des souches *A.baumannii* collectées ont des valeurs de CMI très élevées pour la ciprofloxacine, allant de 16 à 128 µg/ml. Bakour *et al.* rapportent que 95.7% des isolats d'*A.baumannii* sont résistantes à la ciprofloxacine avec des CMI de 12 à > 32 µg/ml [61]. De même Al-Agamy *et al.* décrivent des valeurs de CMI très élevées allant de 1 à >256 µg/ml pour les souches d'*A.baumannii* résistantes à ciprofloxacine [211].

La situation chez les souches de *P.aeruginosa* est pareille ou toutes les souches sont résistantes à la ciprofloxacine avec des valeurs de CMI très élevées oscillant de 8 à 128 µg/ml avec une CMI modale relativement élevée égale à 64µg/ml (Tableau 24). Ces résultats est comparables à celui retrouvé par Cho *et al.* où les valeurs de CMI de la ciprofloxacine sur les souches de *P.aeruginosa* est de 16-256 µg/ml [213]. Cependant, elle est supérieure à ceux rapportée par Mansouri *et al.* qui décrit des valeurs de CMI égale à 2 µg/ml [214].

5. 3. Associations proprement dites

Les résultats des tests d'associations à base de colistine réalisés par la méthode de l'échiquier (checkerbord) sont consignés dans le tableau 25. Ainsi, les *Enterobacteriaceae* productrices de β-lactamases et les non fermentaires résistants aux carbapénémases collectés sont soumis à 105 et 180 diverses combinaisons associant la colistine à l'imipénème, l'amikacine ou à la ciprofloxacine respectivement.

Tableau 25: Type d'activité des associations sur les 35 souches *Enterobacteriaceae* testées

Souche	N°	COL+ IMP		COL + AK		COL +CIP	
		FICI	Résultats	FICI	Résultats	FICI	Résultats
<i>E.coli</i>	1	0.75	Ind	0.75	Ind	1	Ind
	4	0.31	Syn	0.75	Ind	0.38	Syn
	5	1.06	Ind	0.5	Syn	1	Ind
	7	0.19	Syn	1	Ind	1	Ind
	10	0.63	Ind	0.5	Syn	0.18	Syn
	13	0.38	Syn	1	Ind	0.75	Ind
	14	0.75	Ind	0.5	Syn	0.5	Syn
	16	0.5	Syn	0.75	Ind	0.31	Syn
	23	0.63	Ind	0.5	Syn	0.63	Ind
	24	0.5	Syn	0.75	Ind	1	Ind
	25	1	Ind	0.38	Syn	0.32	Syn
	29	0.5	Syn	1	Ind	0.75	Ind
	32	1	Ind	0.75	Ind	1	Ind
	3	0.49	Syn	0.18	Syn	0.38	Syn
	17	0.5	Syn	0.75	Ind	1	Ind
	20	0.75	Ind	0.5	Syn	0.75	Ind
	22	0.5	Syn	0.5	Syn	0.5	Syn
	27	0.75	Ind	0.63	Ind	0.75	Ind
	28	0.5	Syn	0.31	Syn	0.38	Syn
	30	0.63	Ind	0.75	Ind	1	Ind
<i>K. pneumoniae</i>	9	0.5	Syn	1	Ind	0.38	Syn
	6	0.38	Syn	0.75	Ind	0.75	Ind
	7	1	Ind	0.5	Syn	0.38	Syn
	10	0.5	Syn	0.75	Ind	1	Ind
	12	0.75	Ind	1	Ind	0.75	Ind
	21	0.31	Syn	0.38	Syn	0.31	Syn
	22	1	Ind	1	Ind	2.25	Ind
	23	0.28	Syn	0.38	Syn	0.5	Syn
	24	0.38	Syn	0.75	Ind	0.75	Ind
	25	0.5	Syn	0.5	Syn	0.32	Syn
<i>E.cloacae</i>	27	1	Ind	0.38	Syn	1	Ind
	29	0.5	Syn	0.63	Ind	0.5	Syn
<i>E.cloacae</i>	2	0.31	Syn	0.38	Syn	1	Ind
	10	0.38	Syn	1	Ind	0.75	Ind
	7	1	Ind	1	Ind	0.75	Ind

Parmi les 35 souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases les espèces *K. pneumoniae* réagissent le mieux aux diverses associations proposées. Mieux encore l'association est souvent de type synergique où la combinaison colistine - imipénème est la meilleure avec un taux de synergie très élevée dépassant les 66 % (Figure 29).

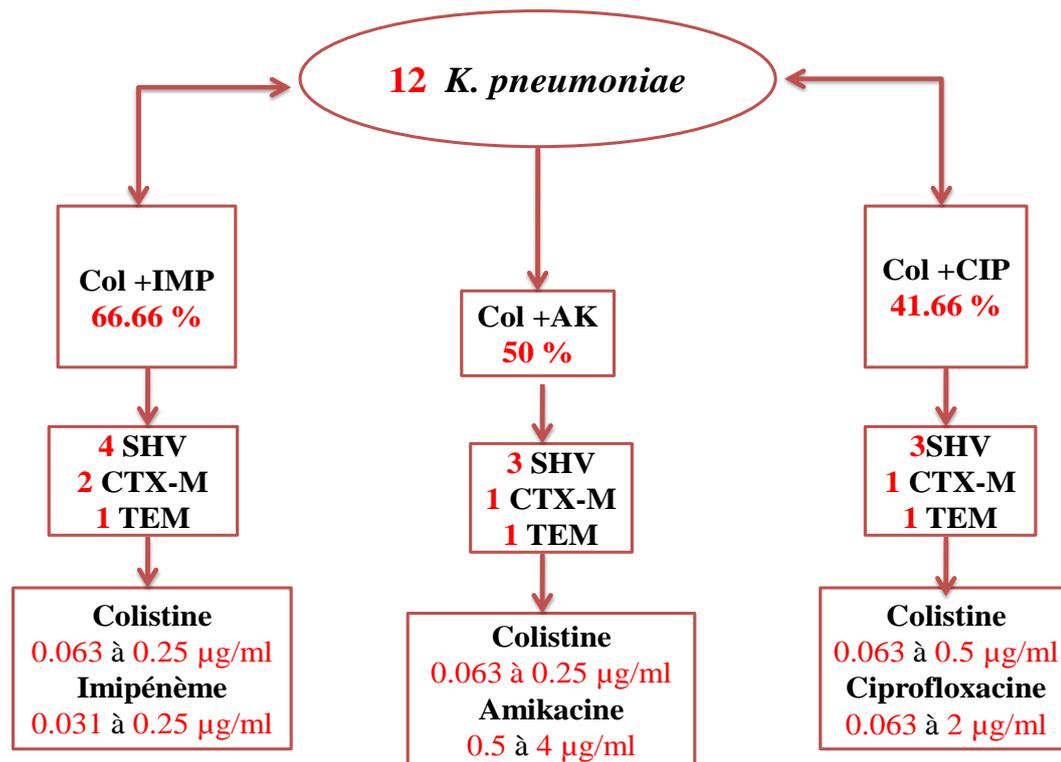


Figure 29: Activité synergique d'association à base de colistine sur *K. pneumoniae*

Cette activité synergique est observée surtout chez les souches *K. pneumoniae* productrices de BLSE aussi bien de type SHV (n=4), CTX-M (n=2) ou encore TEM (n=1) (Tableau 25). Les concentrations sub-inhibitrices requises pour cette activité synergique est très faible varient de 0.063 à 0.25 µg/ml pour la colistine et de 0.031 à 0.25 µg/ml pour l'imipénème.

Beaucoup d'études rapportent des résultats proches des nôtres. Ainsi, Souli *et al.* décrivent un taux de synergie de l'ordre de 56.3% pour ce même type de combinaison sur des souches de *K. pneumoniae* coproductrices de BLSE et de métallob- β -lactamases type VIM-1[132]. De même Ontong *et al.* ont montré que le taux de synergie de l'association colistine-imipénème est de 36.36% sur les souches de *K. pneumoniae* multirésistantes [136].

Aussi l'association de la colistine avec l'amikacine montre un effet synergique très important de 50%. Cette activité est enregistrée sur les souches de *K. pneumoniae* productrices de HSV (n=3), CTX-M (n=1) et TEM (n=1) (Tableau 25). Ce qui attire l'attention c'est les très faibles concentrations sub-inhibitrices utilisées pour cette

activité variant de 0.063 à 0.25 µg/ml pour la colistine et de 0.5 à 4 µg/ml pour l'amikacine. Ce que rapportent Ontong *et al.* où il signale un effet synergique très élevé de 72.72% sur des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes vis-à-vis de l'association colistine-amikacine [136]. De même, Yu *et al.* parlent d'un traitement combiné de colistine-amikacine ayant entraîné 65% d'effets synergiques et 3.25% d'effets additifs sur 39 isolats de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes [143].

La combinaison colistine-ciprofloxacine pour sa part donne aussi des résultats encourageant avec un effet synergique à hauteur de 41.66% et à des concentrations sub-inhibitrices de 0.063 à 0.5 µg/ml pour la colistine et de 0.063 à 2 µg/ml pour la ciprofloxacine. Cette activité synergique est notée particulièrement chez les souches *K. pneumoniae* qui exhibent une BLSE de type SHV (n=3), CTX-M (n=1) et TEM (n=1) (Tableau 25). Ces résultats est comparable à celui retrouver par Ontong *et al.* où l'effet synergique est de 45.45% [136].

En effet *K. pneumoniae* est un agent pathogène opportuniste important causant des infections communautaire et nosocomiales surtout au sein des populations ayant un système immunitaire affaibli et à l'origine de divers échecs thérapeutiques. Elle constitue une cause fréquente de pneumonies, d'infections urinaires, de bactériémies et autres. De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie sont décrites par plusieurs auteurs, notamment dans les unités de soins intensifs adulte ou pédiatrique [38].

En dehors de leurs résistances naturelles les *K. pneumoniae* sont les plus concernés par la multirésistance. Les résultats des diverses combinaisons constituent ainsi donc une perspective sérieuse de schéma d'approches thérapeutiques en présence de telles souches multirésistantes.

Une vaste étude rétrospective a évalué la survie à 14 jours des patients infectées par *K. pneumoniae* productrices de carbapénemase type KPC et constaté que le traitement combiné à base de la colistine était associé à une survie favorable par rapport à la monothérapie [11]. De même, une petite étude de cohorte rétrospective a évalué 34 patients atteints de bactériémie causée par les mêmes bactéries et a constaté que la mortalité à 28 jours était plus faible chez les patients recevant des associations par rapport aux patients recevant la colistine seule [11]. Bien que les preuves cliniques soutenant l'utilisation d'associations à base de colistine sur des souches *K. pneumoniae*

multirésistantes soient concluantes on ne comprend toujours pas pourquoi les différents consortiums ne proposent pas de telles approches.

Aussi les souches *E. coli* productrices de β -lactamases montrent une sensibilité appréciable surtout à l'association colistine-imipénème où l'effet synergique est élevé avoisine les 52.38% (Figure 30).

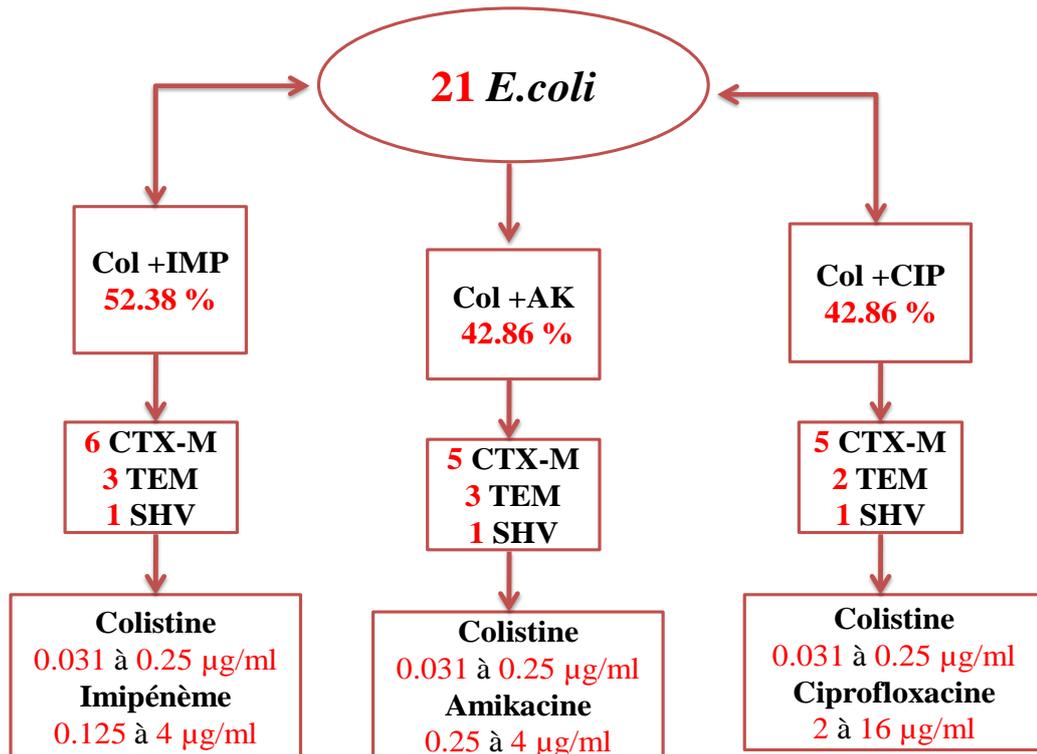


Figure 30 : Activité synergique d'association à base de colistine sur *E. coli*

Cette activité est t'observer surtout chez les souches *E. coli* productrices de BLSE type CTX-M (n=6), TEM (n=3) et SHV (n=1) (Tableau 25). Mieux encore les concentrations sub-inhibitrices requises pour cette activité synergique est très faible varient de 0.031 à 0.25 $\mu\text{g/ml}$ pour la colistine et de 0.125 à 4 $\mu\text{g/ml}$ pour l'imipénème. Dans une étude menée par Dundar *et al.* ce type de combinaison s'est révélé la plus efficaces par apport aux autres combinaisons sur les souches *E. coli* résistantes aux carbapénèmes avec un taux de synergies très élevés de 75% [215].

Les combinaisons colistine-amikacine et colistine-ciprofloxacine montrent aussi des activités synergiques prometteuses avec des taux similaires égaux à 42.86% pour chaque une (Tableau 25). Les concentrations sub-inhibitrices requises pour cette activité synergique sont relativement faibles variant de 0.031 à 0.25 µg/ml pour la colistine, de 0.25 à 4 µg/ml pour l'amikacine et de 2 à 16 µg/ml pour la ciprofloxacine. Situation rapportée par Zhou *et al.* qui révèlent que l'association colistine - amikacine donne un effet synergique très important avec une diminution significative de la CMI de la colistine par rapport à la CMI seule sur des souches *E. coli* coproductrices de NDM-5 et MCR-1 [140]. Concernant l'association colistine-ciprofloxacine nous n'avons trouvé aucune étude évaluant ce type de combinaison sur *E. coli* et le comparant à d'autres combinaisons antimicrobiennes.

Pour les deux souches *E. cloacae* l'effet synergique de la combinaison colistine - imipénème est enregistré seulement chez une d'entre (Figure 31).

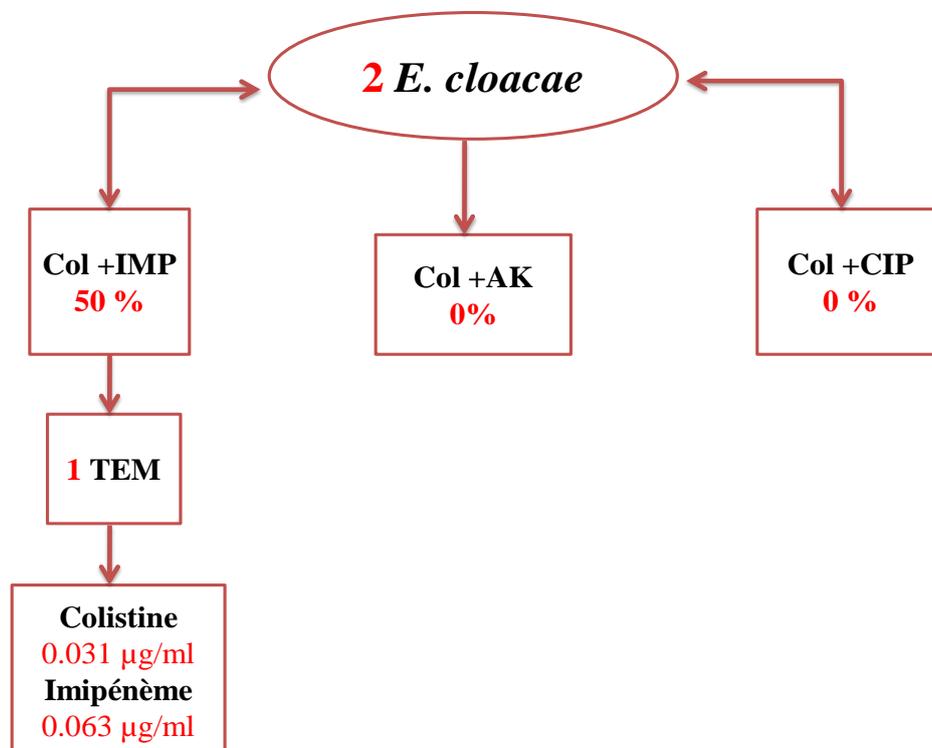


Figure 31 : Activité synergique d'association à base de colistine sur *E. cloacae*.

Elle est productrice de BLSE type TEM est isolée de pus d'une femme de 34 ans séjourné dans le service d'urologie (Tableau 25). Cette souche exhibe des concentrations sub-inhibitrices de 0.031 µg/ml pour la colistine et de 0.063 µg/ml pour l'imipénème. Par ailleurs les autres combinaisons est deviennent inefficaces sur ces deux souches *E. cloacae*. Compte tenu du nombre limité de souches isolées de cette espèce nous ne pouvons se prononcé la situation qui prévaut dans les hôpitaux de Annaba.

Cependant l'étude menée en 2016 par Yang *et al.* a montré que l'association colistine - imipénème était efficace sur des souches *E. cloacae* multirésistantes et que son application a permis de traiter avec succès un cas de pneumonie sévère [216].

Sachant que ces derniers moments *Enterobacter cloacae* est apparu comme un important agent pathogène opportuniste responsable de diverses infections nosocomiales. On lui associe les bactériémies, les infections des voies respiratoires inférieures, les infections de la peau et des tissus mous, les infections des voies urinaires et intra-abdominales. Tout cela à cause de son aptitude à développer une résistance au cours du traitement et par conséquent, au moins deux antibiotiques doivent être prescrits simultanément lors les infections graves. Dans ce cas l'association colistine-imipénème constitue une opportunité d'antibiothérapie adaptée aux souches multirésistantes de cette espèce.

Aucun effet antagoniste n'a été détecté pour les trois combinaisons testées aussi bien sur les souches *E. coli* que sur *K. pneumoniae* et *E. cloacae* productrices de β-lactamases.

L'émergence et la diffusion de souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes par production de carbapénemases est l'une des menaces les plus importantes pesant sur la santé publique. Les conséquences se traduisent par des difficultés thérapeutiques très importantes. Pour faire face à ce défi causé par ces bactéries multirésistantes, les praticiens préconisent entre autre l'utilisation d'associations d'antibiotiques préférentiellement à activité de type synergique.

Des études antérieures in vitro ont montré que l'association de la colistine avec les carbapénèmes donnait une bonne activité antibactérienne sur *A. baumannii* et *P.aeruginosa* notamment résistantes aux carbapénèmes. Car ce type d'association

représente des taux élevés de synergie et de bactéricidie avec un faible antagonisme et un développement moindre de la résistance sur ces souches. C'est le cas des résultats obtenus par Zusman *et al.* qui ont montré que le taux de synergie de l'association colistine-carbapénèmes dépassait les 80% pour *A. baumannii* et au-delà de 60% pour *P.aeruginosa* [23]. De même Ramadan *et al.* Ayant décrit des résultats similaires pour ce type de combinaison où le taux de synergie était de 83.3% et de 63.6% pour *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes, respectivement [10]. Une étude effectuée en Vietnam sur 56 souches *Acinetobacter baumannii* résistantes aux carbapénèmes met en évidence un taux de synergie très importants lorsque en associée la colistine avec le méropénème de 68% et de 36% avec l'imipénème [129]. Daoud *et al.* rapportent un taux de synergie très important pour l'association colistine-carbapénèmes de 63.64% et de 54.55% sur *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes [217].

Pour notre part les résultats ont montré que l'association de la colistine avec l'imipénème se présente comme la meilleure combinaison efficace sur les souches *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes avec un taux de synergie de 57.14 % et de 46.15 % respectivement (Figure 32 et 33) (Tableau 26 et 27).

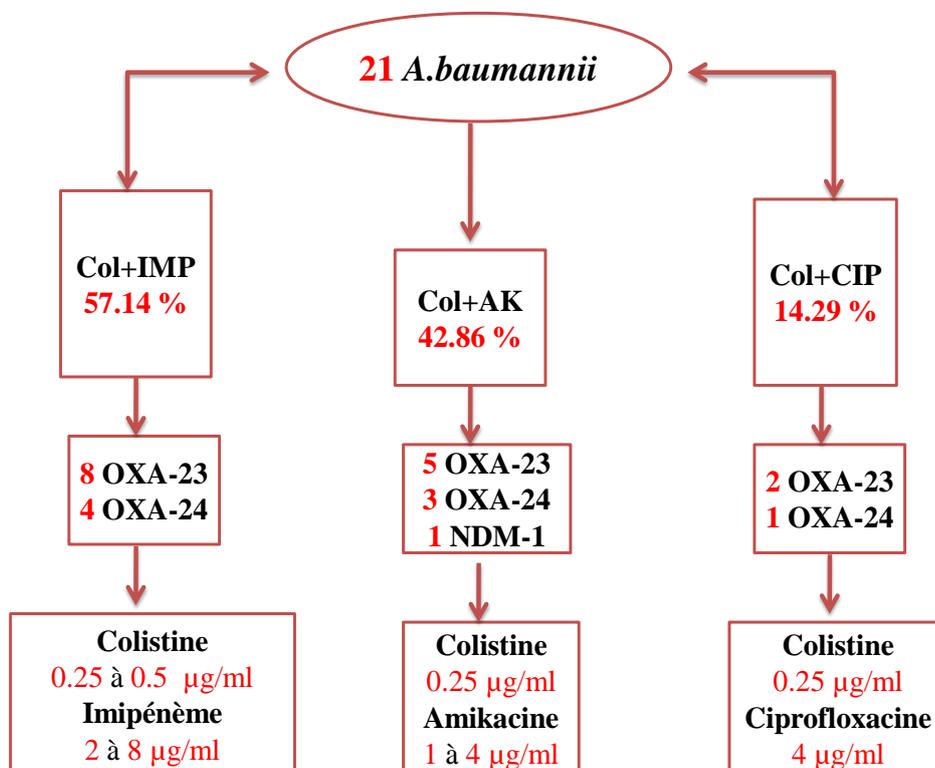


Figure 32 : Activité synergique d'association à base de colistine sur *A.baumannii*

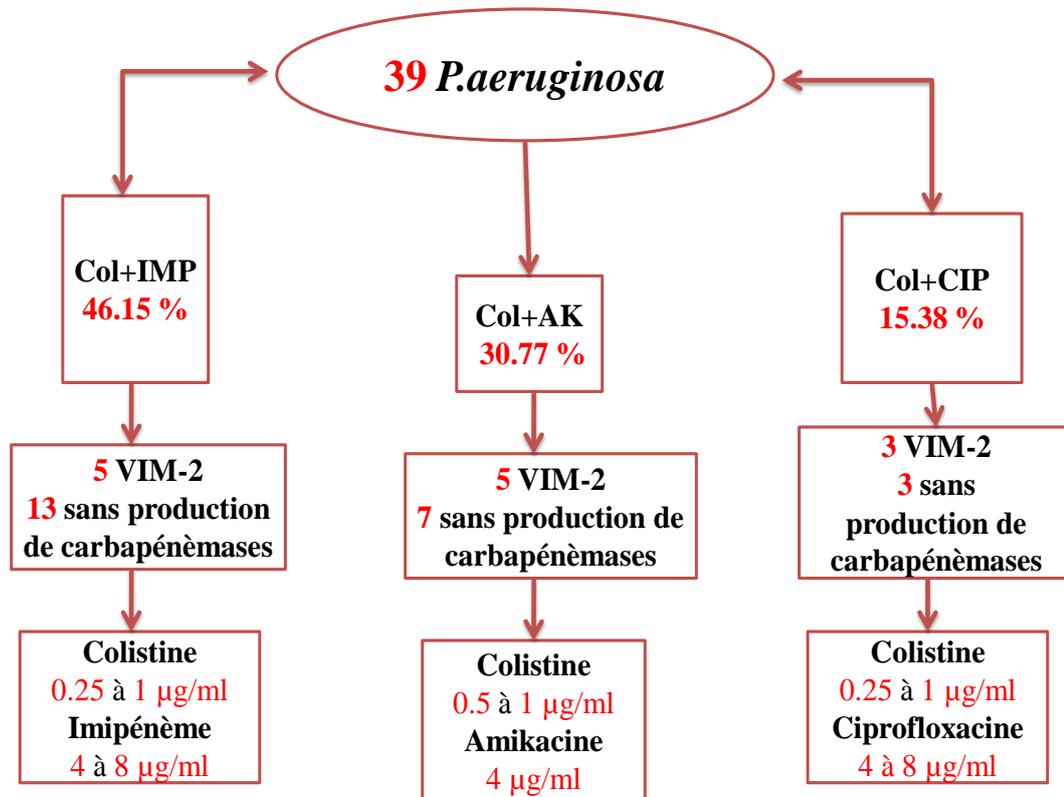


Figure 33 : Activité synergique d'association à base de colistine sur *P. aeruginosa*

En plus on enregistre une importante diminution de la CMI de l'imipénème chez les deux espèces. Mieux encore les concentrations sub-inhibitrices requises pour cette activité synergique sur les souches *A. baumannii* est très faible varient de 0.25 à 0.5 µg/ml pour la colistine et de 2 à 8 µg/ml pour l'imipénème. De plus la concentration sub-inhibitrice modale de la colistine et de 0.5 µg/ml associée à une concentration sub-inhibitrice modale de l'imipénème de 8µg/ml. Ces concentrations est observée surtout chez les souches *A.baumannii* productrices d'oxacillinases type OXA-23 (n=8) et OXA-24 (n=4).

Pour les souches de *P.aeruginosa* les concentrations sub-inhibitrices utilisées pour cette association oscillent de 0.25 à 1 µg/ml pour la colistine et de 4 à 8 µg/ml pour l'imipénème. Ainsi les CMI modales de la colistine et de l'imipénème sont égales à 0.25 µg/ml et 8µg/ml respectivement. L'activité synergique est notée surtout chez les souches *P.aeruginosa* résistantes à l'imipénème sans production de carbapénèmases

(n=13) et productrices de métallob- β -lactamases type VIM-2 (n=5). Cela convient à la situation que l'on rencontre dans divers structures hospitalières et autre en Algérie.

Justement, plusieurs études aussi bien à l'échelle mondiale que chez nous rapportent une émergence sans précédent de ces enzymes chez des isolats aussi bien à partir de prélèvements pathologiques que de l'environnement hospitalier [59].

Ainsi, nos résultats peuvent constituer une base d'un consensus de traitement thérapeutique comportant une association colistine - imipénème pouvant contribué à la résolution du problème d'émergence et de dissémination des souches *A. baumannii* productrices d'oxacillinase notamment type OXA-23 et VIM-2.

Tableau 26: Type d'activité des associations sur les 21 souches *A.baumannii*-RC

Souches	COL+ IMP		COL + AK		COL +CIP	
	FICI	Résultats	FICI	Résultats	FICI	Résultats
1	0.38	Syn	0.38	Syn	0.31	Syn
2	0.5	Syn	1.25	Ind	0.63	Ind
3	0.63	Ind	0.38	Syn	1	Ind
4	0.38	Ind	0.25	Syn	0.75	Ind
5	0.75	Ind	0.56	Ind	0.63	Ind
6	0.38	Syn	0.25	Syn	0.63	Ind
7	0.75	Ind	0.75	Ind	0.63	Ind
8	0.75	Ind	0.75	Ind	0.75	Ind
9	0.25	Syn	0.38	Syn	0.38	Syn
10	0.5	Syn	1	Ind	0.63	Ind
11	0.5	Syn	0.31	Syn	0.75	Ind
12	0.31	Syn	0.38	Syn	1	Ind
13	0.63	Ind	0.75	Ind	0.25	Syn
14	1	Ind	0.63	Ind	1	Ind
15	0.5	Syn	0.63	Ind	0.75	Ind
16	0.25	Syn	0.5	Syn	0.63	Ind
17	0.5	Syn	1	Ind	1	Ind
18	1	Ind	1	Ind	0.75	Ind
19	0.31	Syn	0.75	Ind	0.63	Ind
20	0.5	Syn	0.63	Ind	0.75	Ind
21	0.63	Ind	0.38	Syn	0.63	Ind

Tableau 27: Type d'activité des associations sur les 39 souches de *P.aeruginosa*-RC

Souches	COL +IMP		COL +Ak		Col +CIP	
	FICI	Résultats	FICI	Résultats	FICI	Résultats
1	0.5	Syn	0.38	Syn	0.63	Ind
2	0.5	Syn	0.75	Ind	0.75	Ind
3	0.56	Ind	0.63	Ind	0.63	Ind
4	0.38	Syn	1	Ind	0.75	Ind
5	0.56	Ind	0.38	Syn	0.38	Syn
6	0.63	Ind	0.75	Ind	1	Ind
7	0.38	Syn	0.63	Ind	0.75	Ind
8	0.75	Ind	1	Ind	0.75	Ind
9	0.75	Ind	0.75	Ind	1	Ind
10	0.5	Syn	1	Ind	0.63	Ind
11	0.25	Syn	0.38	Syn	0.75	Ind
12	0.75	Ind	1	Ind	0.75	Ind
13	0.38	Syn	0.75	Ind	0.5	Syn
14	0.63	Ind	0.19	Syn	1	Ind
15	0.38	Syn	0.75	Ind	0.75	Ind
16	0.25	Syn	0.25	Ind	0.63	Ind
17	0.75	Ind	0.38	Syn	1	Ind
18	0.63	Ind	1	Ind	0.63	Ind
19	0.38	Syn	0.62	Ind	0.25	Syn
20	1	Ind	0.5	Syn	0.38	Syn
21	0.75	Ind	0.75	Ind	1	Ind
22	0.25	Syn	0.63	Ind	1	Ind
23	1	Ind	0.56	Ind	0.63	Ind
24	0.63	Ind	0.75	Ind	1	Ind
25	0.38	Syn	0.75	Ind	0.38	Syn
26	1	Ind	0.63	Ind	0.75	Ind
27	0.63	Ind	0.38	Syn	0.63	Ind
28	0.25	Syn	0.25	Syn	1	Ind
29	0.75	Ind	0.25	Syn	0.75	Ind
30	0.38	Syn	0.75	Ind	1	Ind
31	0.75	Ind	0.25	Syn	0.38	Syn
32	0.5	Syn	0.25	Syn	0.63	Ind
33	1	Ind	0.75	Ind	0.75	Ind
34	0.75	Ind	0.75	Ind	0.63	Ind
35	0.38	Syn	0.63	Ind	0.63	Ind
36	0.75	Ind	0.38	Syn	1	Ind
37	0.19	Syn	0.75	Ind	1	Ind
38	0.75	Ind	0.75	Ind	0.63	Ind
39	0.5	Syn	0.75	Ind	0.75	Ind

L'association de la colistine avec les aminosides en pratique clinique n'est pas recommandée en raison de la toxicité élevée des deux familles antibactériennes [88,140]. Cependant les résultats publiés dans des études testent cette combinaison in vitro et in vivo montre qu'elle est très efficace avec moindre toxicité. En effet, Herrmann *et al.* révèlent que l'association colistine-tobramycine est plus actifs que les antibiotiques individuels pour tuer *P. aeruginosa* dans des biofilms in vitro, et réduit de manière significative le nombre de souches de *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection pulmonaire de rat et chez des patients atteints de fibrose kystique [218]. Même constat rapportée par Tascini *et al.* sur des souches de *P.aeruginosa* multirésistantes [142]. De même Fulnecky *et al.* ont montré que une telle combinaison à permis le traitement d'une méningite à *A. baumannii* multiresistant [141].

Dans la présente étude l'association de la colistine avec l'amikacine donne aussi des résultats prometteurs. Cette combinaison agit de manière synergique sur les souches *A.baumannii* et *P. aeruginosa* avec un taux à hauteur de 42.86% et de 30.77% respectivement (Tableau 27 et 28). Noté que la synergie chez les souches *A.baumannii* est détectée à des concentrations sub-inhibitrices de 0.25 µg/ml pour la colistine et oscillant de 1 à 4 µg/ml pour l'amikacine. De plus la concentration sub-inhibitrice modale de la colistine est de l'amikacine égale 0.25 µg/ml et 4 µg/ml respectivement. Cette activité est t'observer notamment chez les souches *A.baumannii* productrices d'oxacillinases type OXA-23 (N= 5), OXA-24 (N=3) et NDM-1 (N= 1).

Tandis que pour *P.aeruginosa* l'activité synergique est notée particulièrement chez les souches résistantes à l'imipénème sans production de carbapénèmases (n=7) et productrices de métallob-lactamase type VIM-2 (n= 5). Les concentrations sub-inhibitrices requises pour cette activité synergique allant de 0.5 à 1 µg/ml pour la colistine et de 4 µg/ml pour l'amikacine. La concentration sub-inhibitrice modale de 0.5µg/ml pour la colistine.

Concernant l'association colistine-ciprofloxacine le taux de la synergie énoncé est varié d'une étude à l'autre en fonction de l'espèce considérée et la méthode utilisée. Une synergie de 100% est mise en évidence entre la colistine et la ciprofloxacine par méthode de l'échiquier sur des souches de *P.aeruginosa* multirésistantes [138] Cependant, l'étude menée par Kheshti *et al.* ont rapporté que l'association de la

colistine avec la levofloxacin et la ciprofloxacine par la méthode E-test sur des souches *A. baumannii* multirésistantes donne un effet synergique faible de 5% et 15% respectivement [137]. D'autres études testent la combinaison colistine- levofloxacin par méthode de cinétique. Ils ont trouvées une synergie de 90.9% sur des souches de *P.aeruginosa* dans les 4 premières heures de croissance [25] et de 84.8% sur *A .baumannii* après 6 h de croissance [139].

Nos résultats révèlent un effet synergique légèrement faible aussi bien sur *A.baumannii* que sur *P.aeruginosa* résistants à l'imipénème avec un taux de 14.29% et 15.38% respectivement (Tableau 27 et 28). Cette activité synergique est détectée chez deux souches *A.baumannii* hébergent l'enzyme OXA-23 et une souche abritent OXA-24 Les concentrations sub-inhibitrices notées pour ce type d'association sur les souches *A.baumannii* et de 0.25 µg/ml pour la colistine et 4 µg/ml pour la ciprofloxacine.

Pour *P.aeruginosa* les concentrations sub-inhibitrices allant de 0.25 à 1 µg/ml pour la colistine et de 4 à 8 µg/ml pour la ciprofloxacine. Alor que la concentration sub-inhibitrice modale et de 0.25 µg/ml pour la colistine et de 8 µg/ml pour la ciprofloxacine, respectivement. Ces concentrations sont révélées chez 3 souches de *P.aeruginosa* productrice de VIM-2 et 3 souches résistants à l'imipénème sans production de carbapénèmases.

A noter qu'aucun effet antagoniste n'a été observé pour les trois combinaisons testées aussi bien sur les souches *A. baumannii* que sur *P.aeruginosa* résistants au carbapénème.

Les résultats de la présente étude nous permettent de dire que la colistine à de faibles concentrations non seulement rétablie mais aussi améliore l'activité antibactérienne de l'imipénème ou l'amikacine sur les souches *A. baumannii* et *P.aeruginosa* résistants aux carbapénèmes. De telles associations représentent une alternative thérapeutique pouvant contribuer à la résolution du problème d'émergence et de dissémination de souches BGN-NF productrices d'oxacillinases type OXA-23 et métallo-β-lactamases type VIM-2 fréquemment isolées dans les services de soins intensifs en Algérie. Des investigations supplémentaires in vivo sont cependant nécessaires pour juger de l'efficacité de telles combinaisons.

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'augmentation et l'essaimage des souches de bacilles à Gram négatif résistantes à de multiples éléments de différentes classes d'antibiotiques incluant les β -lactamines, les aminosides et les quinolones qui comptent parmi les molécules les plus prescrites, en particulier en milieu hospitalier représentent un problème épineux dans la prise en charge antibio-thérapeutiques aux CHU-Annaba.

En effet, durant la période de janvier 2015 à janvier 2019 plus de 67% des BGN isolées sont rendues responsables d'infection chez les malades des services hospitaliers d'Annaba. Parmi eux les bacilles à Gram négatif multirésistants représentent 37.63%.

Sur le plan taxonomique on note une légère prédominance des espèces multirésistantes de la famille des *Enterobacteriaceae* (n=83 ; 58.04%), dont *E.coli* (n= 32; 38.55%), *Klebsiella sp.* (n=29 ; 34.94%), *Enterobacter sp.* (n=12 ; 14.46%) et *Citrobacter sp.* (n=10 ; 12.05%). Les bacilles à Gram négatif restants (n=60 ; 41.96%) sont représenté par *P.aeruginosa* (n= 39; 65%) et *A.baumannii* (n= 21; 35 %).

Le profile de résistance aux antibiotiques est très variable chez l'ensemble des souches multirésistantes considérées, surtout chez les *Enterobacteriaceae*. Pour ces bactéries, la situation est très inquiétante, où l'on enregistre une résistance très élevée aux C3G. Ceci engendre un phénotype de production de BLSE égale à 39.76% représenté par *E.coli* (60.60 %), *K. pneumoniae* (33.33%) et *E.cloacae* (6.06%).

Pour les BGN-NF-MR la résistance est beaucoup plus accru vis-à-vis des β -lactamines y-compris les C3G et les carbapénèmes avec une totale résistance à l'imipénème.

Vis-à-vis des aminosides le taux de résistance dépasse les 60% pour la gentamicine et les 20% pour l'amikacine concernent les entérobactéries. Pour les BGN-NF une résistance totale à la gentamicine, et dépasse les 50% pour l'Amikacine.

Concernent les fluoroquinolones, le taux de résistance varie entre 25% et 78% pour la ciprofloxacine ont été noté chez les entérobactéries et de 100% chez les BGN-NF.

A noté que toutes les souches de BGN multirésistantes retenues sont sensibles à la colistine, seulement 12 souches de *P.aeruginosa* présentent une résistance intermédiaire avec une valeur de CMI de 4 µg / ml.

Les supports génétiques codants pour la production de β-lactamases sont représentés essentiellement par CTX-M, TEM et HSV chez les entérobactéries. Et par OXA-23, OXA-24, NDM-1 et VIM-2 chez les BGN-NF. Le taux et la diversité des gènes de résistance témoignent d'une situation alarmante affaiblissant l'outil de traitement des patients dans ces services.

Les associations à base de colistine proposées donnent une activité de type synergique dans la plupart des cas. Elle est meilleure lorsque en associée la colistine avec les carbapénèmes (imipénème). Ceci serait dû à l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe par la colistine, favorisant l'obtention de concentrations intracellulaires inhibitrices en carbapénèmes. Ce qui revalorise les carbapénèmes dans la prise en charge antibio-thérapeutique en cas d'infection par les BGN producteurs de BLSE ou de carbapénèmases.

La colistine combinée aux aminosides (amikacine) donne aussi des résultats prometteurs aussi bien sur les *Enterobacteriaceae* que les BGN-NF multirésistants testées.

L'association de la colistine avec les fluoroquinolones (ciprofloxacine) est apparaitre active notamment sur les entérobactéries testées.

A noter qu'aucun effet antagoniste n'a été observé pour les trois combinaisons proposées sur les BGN-MR testées.

Les propositions d'associations à base de colistine du présent travail donnent espoir d'amélioration de la prise en charge des infections causées par de BGN multirésistants. Résultats encourageant enregistrés *in vitro* et reste aux professionnelles de la santé (clinicien et autre) après essais indispensables d'adopter telle ou telle association à base de colistine en fonction des situations de chaque malade.

La mise en valeur des associations d'antibiotiques dans l'approche antibio-thérapeutique est et reste un moyen le plus approprié dans la lutte contre l'apparition et la diffusion de la résistance aux antimicrobiens. Elle mérite d'être intégrée dans la routine quotidienne de la pratique de santé.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Michel-Briand, Y.** (2009). Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. *Editions L'Harmattan*.
2. **Hollis, A., Ahmed, Z.** (2013). Preserving antibiotics, rationally. *New England Journal of Medicine*, 369(26), 2474-2476.
3. **Mellouk, FZ.** (2016). Evaluation de la résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques « Bactéries isolées dans l'est algérien ». [Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.
4. **Tani, Z.B.A.K., Arlet, G.** (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169-178.
5. **Elouennass, M., Sahnoun, I., Zrara, A., Bajjou, T., Elhamzaoui, S.** (2008). Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Médecine et maladies infectieuses*, 38(1), 18-24
6. **Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.** (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.
7. **Abat, C., Fournier, P.E., Jimeno, M.T., Rolain, J.M., Raoult, D.** (2018). Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality?. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(9), 1687-1697.
8. Review on Antimicrobial Resistance. (2014). *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. Review on Antimicrobial Resistance.
9. **Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B. P., et al.** (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-459.
10. **Cassir, N., Rolain, J.M., Brouqui, P.** (2014). A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in microbiology*, 5, 551.

11. **Munoz, G.** (2015). La colistine : dernière ligne thérapeutique contre les bactéries multirésistantes. Thèse Université Claude-Bernard -Lyon.
12. **Kipnis, É., Guery, B.P.** (2010). Réévaluation de la colistine. *Antibiotiques*, 12(4), 205-227.
13. **Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., Naas, T.** (2016). Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries: une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance!. *Journal des Anti-infectieux*, 18(4), 139-159.
14. **Hayakawa, K., Marchaim, D., Divine, G.W., Pogue, J.M., Kumar, S., Lephart, P., et al.** (2012). Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(9), e646-e648.
15. **Merkier, A.K., Rodríguez, M.C., Togneri, A., Brengi, S., Osuna, C., Pichel, M., et al.** (2013). Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2295-2302.
16. **Arduino, S.M., Quiroga, M.P., Ramírez, M.S., Merkier, A.K., Errecalde, L., Di Martino, A., et al.** (2012). Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *Journal of medical microbiology*, 61(10), 1417-1420.
17. **Mamma, C., Bonura, C., Di Bernardo, F., Aleo, A., Fasciana, T., Sodano, C., et al.** (2012). Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Eurosurveillance*, 17(33), 20248.
18. **Veziris, N., Robert, J.** (2010). Résistance aux antituberculeux et impasse thérapeutique. *médecine/sciences*, 26(11), 976-980.
19. **Brändli, O., Dreher, D., Morger, D.** (1993). Results of short-term tuberculosis therapy with isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 123(25), 1300-1306.

-
20. **Denes, É., Hidri, N.** (2009). Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques*, 11(2), 106-115.
21. **Mikhail, S., Singh, N.B., Kebriaei, R., Rica, S.A., Stamper, K.C., Castanheira, M., Rybak, M.J.** (2019). Evaluation of the synergy of ceftazidime-avibactam in combination with meropenem, amikacin, aztreonam, colistin, or fosfomycin against well-characterized multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(8), e00779-19.
22. **Klastersky, J., Zinner, S.H.** (1982). Synergistic combinations of antibiotics in Gram-negative bacillary infections. *Reviews of infectious diseases*, 4(2), 294-301.
23. **Zusman, O., Avni, T., Leibovici, L., Adler, A., Friberg, L., Stergiopoulou, T., et al.** (2013). Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), 5104-5111.
24. **Zhou, Y.F., Tao, M.T., Feng, Y., Yang, R.S., Liao, X.P., Liu, Y.H., Sun, J.** (2017). Increased activity of colistin in combination with amikacin against *Escherichia coli* co-producing NDM-5 and MCR-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 1723-1730.
25. **Richards, R.M.E., Xing, D.K.** (1993). Investigation of synergism between combinations of ciprofloxacin, polymyxin, sulphadiazine and p-aminobenzoic acid. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 45(3), 171-175.
26. **Niang, O.** (2003). Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires (Doctoral dissertation, Thèse Pharm., Dakar).
27. **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H.** (2000). Bactériologie clinique. Ellipses Edition Marketing SA.
28. **Floret, N., Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D.** (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*: origine exogène ou endogène de la bactérie responsable?. *Pathologie Biologie*, 57(1), 9-12.
29. **Fauchère, J.L., Avril, J.L.** (2002). Bactériologie générale et médicale.

- 30. Melot, B., Colot, J., Guerrier, G.** (2015). Bacteremic community-acquired infections due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological presentation in New Caledonia, 2008–2013. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 29-31.
- 31. Xu, M., Fu, Y., Fang, Y., Xu, H., Kong, H., Liu, Y., et al.** (2019). High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing meningitis in Eastern China. *Infection and drug resistance*, 12, 641.
- 32. Ferreira, R.L., da Silva, B., Rezende, G.S., Nakamura-Silva, R., Pitondo-Silva, A., Campanini, E.B., et al.** (2019). High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Frontiers in microbiology*, 9, 3198.
- 33. Mezzatesta, M.L., Caio, C., Gona, F., Cormaci, R., Salerno, I., Zingali, T., et al.** (2014). Carbapenem and multidrug resistance in Gram-negative bacteria in a single centre in Italy: considerations on in vitro assay of active drugs. *International journal of antimicrobial agents*, 44(2), 112-116.
- 34. Mancini, S., Poirel, L., Tritten, M.L., Lienhard, R., Bassi, C., Nordmann, P.** (2018). Emergence of an MDR *Klebsiella pneumoniae* ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(3), 821-823.
- 35. Ktari, S., Mnif, B., Louati, F., Rekik, S., Mezghani, S., Mahjoubi, F., Hammami, A.** (2011). Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 β -lactamase in a Tunisian university hospital. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(7), 1644-1646.
- 36. Nasr, A.B., Decré, D., Compain, F., Genel, N., Barguellig, F., Arlet, G.** (2013). Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 4089-4090.
- 37. Belbel, Z.** (2014). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. [Thèse de doctorat en microbiologie appliquée]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.
- 38. Barguigua, A., El Otmani, F., Lakbakbi El Yaagoubi, F., Talmi, M., Zerouali, K., Timinouni, M.** (2012). First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing

- NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 121(7), 675-677.
- 39. Touati, A., Mairi, A.** (2020). Carbapenemase-producing Enterobacterales in Algeria: a systematic review. *Microbial Drug Resistance*, 26(5), 475-482.
- 40. Jauréguy, F.** (2009). Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Médecine sciences*, 25(3), 221-223.
- 41. Rahal, J.J.** (2000). Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem?. *Clinical Microbiology and Infection*, 6, 2-6.
- 42. Gauthier, L., Dortet, L., Cotellon, G., Creton, E., Cuzon, G., Ponties, V., et al.** (2018). Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012-2013. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(8).
- 43. Ortega, A., Sáez, D., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Lara, N., Aracil, B., et al.** (2016). Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2131-2138.
- 44. Abujnah, A.A., Zorgani, A., Sabri, M.A., El-Mohammady, H., Khalek, R.A., Ghenghesh, K.S.** (2015). Multidrug resistance and extended-spectrum β -lactamases genes among *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections in Northwestern Libya. *Libyan Journal of Medicine*, 10(1).
- 45. Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Pantel, A. et al.** (2016). Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 35(2), 227-234.
- 46. Fraser, S., Arnett, M., Sinave, C.P.** (2010). *Enterobacter* Infections. *Journal Infectious Diseases*. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/216845-overview>, showall Accessed Jan 2010.
- 47. Oteo, J., Cercenado, E., Vindel, A., Bautista, V., Fernandez-Romero, S., Saez, D., et al.** (2013). Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter*

cloacae in a neonatal intensive care unit. *Journal of medical microbiology*, 62(4), 571-575.

48. Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M. (2013). Prevalence and characterization of extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7(11), 804-811.

49. Brenner, D.J., Grimont, P.A., Steigerwalt, A.G., Fanning, G., Ageron, E., Riddle, C. (1993). Classification of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genospecies. *Int J Syst Bacteriol*, 43, 645-58.

50. Majewski, P., Wiczorek, P., Łapuć, I., Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., et al. (2017). Emergence of a multidrug-resistant *Citrobacter freundii* ST8 harboring an unusual VIM-4 gene cassette in Poland. *International Journal of Infectious Diseases*, 61, 70-73.

51. Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, J. (2017). Antimicrobial resistance and cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China. *Frontiers in microbiology*, 8, 1357.

52. Le Hello, S. (2014). *Salmonella*: une bactérie multi-résistante aux antibiotiques dans nos assiettes. *Journal des Anti-infectieux*, 16(4), 192-198.

53. Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., et al. International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases*, 50(6), 882-889.

54. Zhang, L., Fu, Y., Xiong, Z., Ma, Y., Wei, Y., Qu, X., et al. (2018). Highly prevalent multidrug-resistant *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2104.

55. Touati, M. (2013). Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. [Thèse de doctorat en microbiologie appliquée]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.

- 56. Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L.** (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.
- 57. Morgan, D.J., Liang, S.Y., Smith, C.L., Johnson, J.K., Harris, A.D., Furuno, J. P., et al.** (2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infection control and hospital epidemiology*, 31(7), 716-721.
- 58. Singh, H., Thangaraj, P., Chakrabarti, A.** (2013). *Acinetobacter baumannii*: a brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. *Journal of clinical and diagnostic research*, 7(11), 2602-2605.
- 59. Bakour, S., Olaitan, A. O., Ammari, H., Touati, A., Saoudi, S., Saoudi, K., Rolain, J. M.** (2015). Emergence of colistin-and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 279-285.
- 60. Touati, M., Diene, S.M., Racherache, A., Dekhil, M., Djahoudi, A., Rolain, J. M.** (2012). Emergence of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *International journal of antimicrobial agents*, 40(1), 89-91.
- 61. Bakour, S., Touati, A., Bachiri, T., Sahli, F., Tiouit, D., Naim, M., et al.** (2014). First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(11), 696-701.
- 62. Zohoun, A. G. C., Mocket, D., El Hamzaoui, S.** (2013, January). Résistance à l'imipénème par production de métallobactamases par *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* à l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 71, No. 1, pp. 27-30).
- 63. Hammami, S., Ghozzi, R., Saidani, M., Redjeb, B.** (2011). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. *La Tunisie médicale*, 89(7), 638-643.
- 64. Euzéby, JP.** (2005). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

- 65. Potvin, E.** (2007). Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*. Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval.
- 66. Mahmoud, A.B., Zahran, W.A., Hindawi, G.R., Labib, A.Z., Galal, R.** (2013). 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*, 13, 165-59.
- 67. Matsumoto, M., Shigemura, K., Shirakawa, T., Nakano, Y., Miyake, H., Tanaka, K., et al.** (2012). Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(5), 440 - 444.
- 68. Mirzaei, B., Bazgir, Z. N., Goli, H. R., Iranpour, F., Mohammadi, F., Babaei, R.** (2020). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran. *BMC research notes*, 13(1), 1-6.
- 69. Denton, M., Kerr, K.G.** (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 57-80.
- 70. Lavigne, J.P., Gaillard, J. B., Bourg, G., Tichit, C., Lecaillon, E., Sotto, A.** (2008). Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE: détection de CTX-M et étude de la virulence. *Pathologie Biologie*, 56(7-8), 447-453.
- 71. Liaw, S.J., Lee, Y.L., Hsueh, P.R.** (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International journal of antimicrobial agents*, 35(2), 126-130.
- 72. Meghdas, I., Loïez, C., Baïda, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Husson, M.O., Izard, D.** (2004). Épidémiologie des infections provoquées par les bactéries du «complexe *Burkholderia cepacia*» au cours de la mucoviscidose. *Archives de pédiatrie*, 11(4), 360-366.

- 73. Matthaiou, D.K., Chasou, E., Atmatzidis, S., Tsolkas, P.** (2011). A case of bacteremia due to *Burkholderia cepacia* in a patient without cystic fibrosis. *Respiratory Medicine CME*, 4(3), 144-145.
- 74. Hancock, R.E.** (1997). Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049), 418-422.
- 75. Michalopoulos, A., Falagas, M.E.** (2008). Colistin and polymyxin B in critical care. *Critical care clinics*, 24(2), 377-391.
- 76. Frasca, D., Dahyot-Fizelier, C., Mimoz, O.** (2008). La colistine en réanimation. *Réanimation*, 17(3), 251-258.
- 77. Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L., Paul, M.** (2012). Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical microbiology and infection*, 18(1), 18-29.
- 78.** ANSM, Lettre aux professionnels de santé : 20 Février 2013.
- 79. Soto, A., Lavigne, J.P.** (2007). Polymyxines. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). *Maladies infectieuses*. 8,004-J-10.
- 80. Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., Reynaud-Gaubert, M., Rolain, J.M.** (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(8), 917-934.
- 81. Martis, N., Leroy, S., Blanc, V.** (2014). Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *Journal of Infection*, 69(1), 1-12.
- 82. Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D.** (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 40(9), 1333-1341.
- 83. Cauchie, A.G.** (2018). Résistance des entérobactéries à la colistine: évaluation d'une méthode de CMI en microdilution, prévalence des souches *mcr-1* et description de la population. Thèse Université de Lille. Faculté de Pharmacie.
- 84.** Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 9th Ed. Doc M07-A9.

- 85. Rahal, K.** (2011). Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire. Document édité avec la collaboration de l'OMS. 6^{ème} éd.
- 86. Hindler, J.A., Humphries, R.M.** (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 51(6), 1678-1684.
- 87. Maalej, S.M., Meziou, M.R., Rhimi, F.M., Hammami, A.** (2011). Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against *Enterobacteriaceae*. *Letters in applied microbiology*, 53(5), 546-551.
- 88. Jorgensen, J.H., Ferraro M.J.** (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, 49(11), 1749-1755.
- 89. Chew, K.L., La, M.V., Lin, R.T., Teo, J.W.** (2017). Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *Journal of clinical microbiology*, 55(9), 2609-2616.
- 90. Vourli, S., Dafopoulou, K., Vrioni, G., Tsakris, A., Pournaras, S.** (2017). Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(9), 2528-2530.
- 91. Ito-Kagawa, M., Koyama, Y.** (1980). Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. *The Journal of antibiotics*, 33(12), 1551-1555.
- 92. Aquilini, E., Merino, S., Knirel, Y.A., Regue, M., Tomas, J.M.** (2014). Functional identification of *Proteus mirabilis* eptC gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6689-6702.
- 93. Lin, Q.Y., Tsai, Y.L., Liu, M.C., Lin, W.C., Hsueh, P.R., Liaw, S.J.** (2014). *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5181-5190.

- 94. Gunn, J.S.** (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in microbiology*, 16(6), 284-290.
- 95. Yan, A., Guan, Z., Raetz, C.R.** (2007). An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 36077-36089.
- 96. Chin, C.Y., Gregg, K.A., Napier, B.A., Ernst, R.K., Weiss, D.S.** (2015). A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(12), 7911-7914.
- 97. Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., Miller, S.I.** (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infection and immunity*, 68(11), 6139-6146.
- 98. Kato, A., Tanabe, H., Utsumi, R.** (1999). Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *Journal of bacteriology*, 181(17), 5516-5520.
- 99. Roland, K.L., Martin, L.E., Esther, C.R., Spitznagel, J. K.** (1993). Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *Journal of bacteriology*, 175(13), 4154-4164.
- 100. Jeannot, K., Bolard, A., Plesiat, P.** (2017). Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International journal of antimicrobial agents*, 49(5), 526-535.
- 101. Groisman, E.A.** (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology*, 183(6), 1835-1842.
- 102. Park, S.Y., Groisman, E.A.** (2014). Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system. *Molecular microbiology*, 91(1), 135-144.
- 103. Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., van Duin, D., et al.**(2015). Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical

isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(1), 536-543.

104. Cheng, Y.H., Lin, T.L., Lin, Y.T., Wang, J.T. (2016). Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(6), 3709-3716.

105. Lee, J.Y., Chung, E.S., Na, I.Y., Kim, H., Shin, D., Ko, K.S. (2014). Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(11), 2966-2971.

106. Gutu, A.D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M.K., Jacobs, M.A., Haugen, E., et al. (2013). Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2204-2215.

107. Halaby, T., Kucukkose, E., Janssen, A.B., Rogers, M.R., Doorduijn, D.J., van der Zanden, A.G., et al. (2016). Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(11), 6837-6843.

108. Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D., Vinogradov, E., Seemann, T., et al. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 4971-4977.

109. Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompert, C.M., Alberti, S., Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 72(12), 7107-7114.

110. Fresno, S., Jimenez, N., Izquierdo, L., Merino, S., Corsaro, M.M., De Castro, C., et al. (2006). The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology*, 152(6), 1807-1818.

111. Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J.A., Alberti, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump

contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 177-183.

112. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.

113. Poirel, L., Kieffer, N., Fernandez-Garayzabal, J.F., Vela, A.I., Larpin, Y., Nordmann, P. (2017). MCR-2-mediated plasmid-borne polymyxin resistance most likely originates from *Moraxella pluranimalium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2947-2949.

114. Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*, 8(3).

115. Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 30589.

116. Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317-3324.

117. Yang, Y.Q., Li, Y.X., Lei, C.W., Zhang, A.Y., Wang, H.N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791-1795.

118. Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., et al. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes infections*, 7(1), 1-9.

119. Kieffer, N., Royer, G., Decusser, J.W., Bourrel, A.S., Palmieri, M., De La Rosa, J.M.O., et al. (2019). *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired

phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(9), e00965-19. 119

120. Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging microbes infections*, 9(1), 508-516.

121. Pena, I., Picazo, J.J., Rodríguez-Avial, C., Rodríguez-Avial, I. (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 43(5), 460-464.

122. Jayol, A., Poirel, L., Dortet, L., Nordmann, P. (2016). National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. *Eurosurveillance*, 21(37), 30339.

123. Bialvaei, A. Z., Samadi Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current medical research and opinion*, 31(4), 707-721.

124. Suh, J.Y., Son, J.S., Chung, D.R., Peck, K.R., Ko, K.S., Song, J.H. (2010). Non clonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 560-562.

125. Touati, A., Mairi, A. (2021). Plasmid-determined colistin resistance in the North African countries: A systematic review. *Microbial Drug Resistance*, 27(1), 121-133.

126. Auboyer, C., Beaucaire, G., Drugeon, H., Gouin, F., Granry, J. C., Jarlier, V., et al. (2000). Associations d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie Recommandations de la Société française d'anesthésie et de réanimation. *Médecine et maladies infectieuses*, 30(4), 185-190.

127. Sueke, H., Kaye, S.B., Neal, T., Hall, A., Tuft, S., Parry, C.M. (2010). An in vitro investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. *Investigative ophthalmology visual science*, 51(8), 4151-4155.

128. **Burnichon, N., Texier, A.** (2003). L'antibiogramme: la détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES bactériologie*.
129. **Le Minh, V., Nhu, N.T.K., Phat, V.V., Thompson, C., Lan, N.P.H., Nga, T.V.T., et al.** (2015). In vitro activity of colistin in antimicrobial combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with ventilator-associated pneumonia in Vietnam. *Journal of medical microbiology*, 64(10), 1162.
130. **Gunderson, B.W., Ibrahim, K.H., Hovde, L.B., Fromm, T.L., Reed, M.D., Rotschafer, J.C.** (2003). Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), 905-909.
131. **Kroeger, L.A., Hovde, L.B., Mitropoulos, I.F., Schafer, J., Rotschafer, J.C.** (2007). Colistin methanesulfonate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), 3431-3433.
132. **Souli, M., Rekatsina, P.D., Chryssouli, Z., Galani, I., Giamarellou, H., Kanellakopoulou, K.** (2009). Does the activity of the combination of imipenem and colistin in vitro exceed the problem of resistance in metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates?. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 2133-2135.
133. **Sopirala, M.M., Mangino, J.E., Gebreyes, W.A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J.M., Pancholi, P.** (2010). Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4678-4683.
134. **Jernigan, M.G., Press, E.G., Nguyen, M.H., Clancy, C.J., Shields, R.K.** (2012). The combination of doripenem and colistin is bactericidal and synergistic against colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3395-3398.
135. **Hong, J.H., Clancy, C.J., Cheng, S., Shields, R.K., Chen, L., Doi, Y., et al.** (2013). Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K.pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination

of colistin and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2147-2153.

136. Ontong, J.C., Ozioma, N.F., Voravuthikunchai, S.P., Chusri, S. (2021). Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomycin, and piperacillin on multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Plos one*, 16(1), e0244673.

137. Kheshti, R., Pourabbas, B., Mosayebi, M., Vazin, A. (2019). In vitro activity of colistin in combination with various antimicrobials against *Acinetobacter baumannii* species, a report from South Iran. *Infection and Drug Resistance*, 12, 129.

138. D'Souza, B. B., Padmaraj, S. R., Rekha, P. D., Tellis, R. C., Prabhu, S., Pothan, P. (2014). In vitro synergistic activity of colistin and ceftazidime or ciprofloxacin against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 20(6), 550-554.

139. Wei, W., Yang, H., Hu, L., Ye, Y., Li, J. (2017). Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: In vitro and in a *Galleria mellonella* model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(6), 821-830.

140. Zhou, Y.F., Tao, M.T., Feng, Y., Yang, R.S., Liao, X.P., Liu, Y.H., Sun, J. (2017). Increased activity of colistin in combination with amikacin against *Escherichia coli* co-producing NDM-5 and MCR-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 1723-1730.

141. Fulnecky, E.J., Wright, D., Scheld, W.M., Kanawati, L., Shoham, S. (2005). Amikacin and colistin for treatment of *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Journal of Infection*, 51(5), e249-e251.

142. Tascini, C., Ferranti, S., Messina, F., Menichetti, F. (2000). In vitro and in vivo synergistic activity of colistin, rifampin, and amikacin against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Clinical microbiology and infection*, 6(12), 690.

143. Yu, L., Zhang, J., Fu, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, J., et al. (2019). Synergetic effects of combined treatment of colistin with meropenem or amikacin on carbapenem-

resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 422.

144. Simmons, N.A. (1970). Colistin, sulphamethoxazole, and trimethoprim in synergy against Gram-negative bacteria. *Journal of clinical pathology*, 23(9), 757-764.

145. Ni, W., Shao, X., Di, X., Cui, J., Wang, R., Liu, Y. (2015). In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents*, 45(1), 8-18.

146. Percin, D., Akyol, S., Kalin, G. (2014). In vitro synergism of combinations of colistin with selected antibiotics against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *GMS hygiene and infection control*, 9(2).

147. Albur, M., Noel, A., Bowker, K., MacGowan, A. (2012). Bactericidal activity of multiple combinations of tigecycline and colistin against NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3441-3443.

148. Zhang, J., Yu, L., Fu, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, J., et al. (2019). Tigecycline in combination with other antibiotics against clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro. *Annals of Palliative Medicine*, 8(5), 622-631.

149. Ni, W., Cui, J., Liang, B., Cai, Y., Bai, N., Cai, X., Wang, R. (2013). In vitro effects of tigecycline in combination with colistin (polymyxin E) and sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antibiotics*, 66(12), 705-708.

150. Erikci, O. A., Haciseyitoglu, D., Cag, Y., Gencer, S., Biteker, F., Ozer, S. (2016). In vitro activities of colistin combined with imipenem, tigecycline or cefoperazone-sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* blood-stream isolates. *Disease and Molecular Medicine*, 4(4), 51-54.

151. Claeys, K.C., Fiorvento, A.D., Rybak, M.J. (2014). A review of novel combinations of colistin and lipopeptide or glycopeptide antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infectious diseases and therapy*, 3(2), 69-81.

- 152. Sertcelik, A., Baran, I., Akinci, E., Mumcuoglu, I., Bodur, H.** (2020). Synergistic activities of colistin combinations with meropenem, sulbactam, minocycline, disodium fosfomycin, or vancomycin against different clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Microbial Drug Resistance*, 26(5), 429-433.
- 153. Gordon, N.C., Png, K., Wareham, D.W.** (2010). Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5316-5322
- 154. Galani, I., Orlandou, K., Moraitou, H., Petrikkos, G., Souli, M.** (2014). Colistin/daptomycin: an unconventional antimicrobial combination synergistic in vitro against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, 43(4), 370-374.
- 155. Poly, C., Denis, F.** (2002) .L'érysipèle : donné microbiologique et pathologique. p.296-305.
- 156. Djennane, F., Mohammedi, D., Tiouit, D., Touati, D., Rahal K.** (2009). Examen Cytobactériologique des Urines. Techniques Microbiologiques. Institut Pasteur d'Algérie. p.76.
- 157. Joffin, J. N., Leyral, G.** (2006). Microbiologie technique, TI-Dictionnaire des techniques. *Bordeaux: CRDP d'aquitaine*.
- 158. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., et al.** (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551.
- 159. Suarez, S., Nassif, X., Ferroni, A.** (2015). Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie*, 63(1), 43-52.
- 160. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** .2018. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Ed. Wayne, PA: Institut des normes cliniques et de laboratoire.

-
- 161. Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., Philippon, A.** (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.
- 162. Rodriguez-Bano, J., Lopez-Cerero, L., Navarro, M.D., Diaz de Alba, P., Pascual, A.** (2008). Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1142-1149.
- 163. Franklin, C., Liolios, L., Peleg, A.Y.** (2006). Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3139-3144.
- 164. Bora, A., Sanjana, R., Jha, B.K., Mahaseth, S.N., Pokharel, K.** (2014). Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC research notes*, 7(1), 1-7.
- 165. Toumi, S., Meliani, S., Amoura, K., Rachereche, A., Djebien, M., Djahoudi, A.** (2018). Multidrug-resistant Gram-negative bacilli producing oxacillinases and Metallo- β -lactamases isolated from patients in intensive care unit-Annaba hospital-Algeria (2014-2016). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(07), 107-113.
- 166. Joly-Guillou, M.L.** (2006). Intérêt de l'E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, 15(3), 237-240.
- 167. Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., Roesler, U.** (2014). Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes *CTX-M*, *SHV*, *TEM* and CIT-type AmpCs in *Enterobacteriaceae*. *PloS one*, 9(7), e100956.
- 168. Kusradze, I., Diene, S.M., Goderdzishvili, M., Rolain, J.M.** (2011). Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 164-168.

- 169. Diene, S.M., Bruder, N., Raoult, D., Rolain, J.M.** (2011). Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *International journal of antimicrobial agents*, 37(6), 544-546.
- 170. Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer, A.M., et al.** (2004). Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(11), 4263-4270.
- 171. Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Arakawa, Y.** (2000). A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS microbiology letters*, 184(1), 53-56.
- 172. Ruiz, M., Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Vila, J.** (2007). High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clinical microbiology and infection*, 13(12), 1192-1198.
- 173. Sanger, F., Nicklen, S.** (1992). a. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24(12), 104-8.
- 174. Humphries, R.M.** 2016. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Leber AL, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. p. 7-11. 4th Ed. Washington, DC: ASM Press.
- 175. Lorian, V.** (Ed.). (2005). *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th Ed .Lippincott Williams & Wilkins. p. 365-440.
- 176. Qassimi, L.** (2010). Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (à propos de 147 cas).
- 177. Bouguenoun, W.** (2017). Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. [Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.

- 178. Regnier, B.** (1996). Bacteria, multiresistant to antibiotics, in intensive care units: epidemiological context and strategies of control. *Pathologie-biologie*, 44(2), 113-123.
- 179. Gaudré, N., Drame, B.S., Poudiogo, A., Kassogué, A., Koné, H., Diarra, A.** (2019). Profil de résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées des prélèvements urinaires à l'Hôpital du Mali. *Revue Malienne d'Infectiologie et de Microbiologie*, 14(2), 6-13.
- 180. Elouennass, M., Sahnoun, I., Zrara, A., Bajjou, T., Elhamzaoui, S.** (2008). Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Médecine et maladies infectieuses*, 38(1), 18-24.
- 181. Zogheib E., Dupont H.** 2005. Entérobactéries multirésistantes. Elsevier SAS. P : 153-165.
- 182. Sefraoui, I.E.K.** (2015). *Etude de la résistance aux antibiotiques de Pseudomonas aeruginosa au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien* (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid).
- 183. MESLI, E.** (2014). *Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Acinetobacter spp* (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid).
- 184. Zenati, K., Touati, A., Bakour, S., Sahli, F., Rolain, J.M.** (2016). Characterization of NDM-1-and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. *Journal of Hospital Infection*, 92(1), 19-26.
- 185. Sadeghi, M.** (2019). Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates in Azerbaijan Hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 25(9), 1287-1296.
- 186. Nabti, L.Z., Sahli, F., Radji, N., Mezaghcha, W., Semara, L., Aberkane, S., et al.** (2019). High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* in urine samples from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in Setif, Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 25(3), 386-393.
- 187. Dahmen, S., Bettaieb, D., Mansour, W., Boujaafar, N., Bouallegue, O., Arlet, G.** (2010). Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum

β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Tunisian University hospital. *Microbial drug resistance*, 16(2), 163-170.

188. Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Decré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G., Drissi, M. (2013). Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug Resistance*, 19(3), 185-190.

189. Berrazeg, M., Diene, S.M., Drissi, M., Kempf, M., Richet, H., Landraud, L., Rolain, J.M. (2013). Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PloS one*, 8(4), e61428.

190. LAGHA, N.E.B. (2015). *Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat* (Doctoral dissertation).

191. Ben Haj Khalifa, A., Khedher, M. (2010). Fréquence et profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des hémocultures au CHU de Mahdia. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*.

192. Victoire, G., Anatole, T.A., Fernique, K., Bertin, T.K., Baguy, O.M., Nathalie, G.K., Joseph, D.A. (2019). First Case of Qnr B6 and Qnr B7 Genes in *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Abidjan, Côte D'ivoire. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 1-6.

193. Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., et al. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(9), 1641-1646.

194. Ramoul, A. (2013). Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. [Thèse de doctorat en microbiologie appliquée]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.

195. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN). 2017. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 16^{ème} Rapport d'évaluation (janvier à décembre 2015).

- 196. Tagajdid, M. R., Boumhil, L., Iken, M., Adnaoui, M., Benouda, A.** (2010). Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Médecine et maladies infectieuses*, 40(2), 70-73.
- 197. Mathlouthi, N., Al-Bayssari, C., El Salabi, A., Bakour, S., Gwierif, S.B., Zorgani, A.A., et al.** (2016). Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(07), 718-727.
- 198. khennouchi, N.C.H.** (2016). Evaluation de l'antibiorésistance du genre *Enterobacter* aux antibiotiques. [Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire]. Université Badji Mokhtar -Annaba. Faculté des sciences.
- 199. Mohan, S., Agarwal, J., Srivastava, R., Singh, M.** (2014). Observations on *Citrobacter* species from a tertiary care health center with special reference to multi-drug resistance and presence of CTX-M gene. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 57(3), 439.
- 200. Rezaei, M., Akya, A., Elahi, A., Ghadiri, K., Jafari, S.** (2016). The clonal relationship among the *Citrobacter freundii* isolated from the main hospital in Kermanshah, west of Iran. *Iranian journal of microbiology*, 8(3), 175.
- 201. Rolain, J.M., Loucif, L., Al-Maslmani, M., Elmagboul, E., Al-Ansari, N., Taj-Aldeen, S., et al.** (2016). Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. *New microbes and new infections*, 11, 47-51.
- 202. Khorsi, K., Messai, Y., Hamidi, M., Ammari, H., Bakour, R.** (2015). High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} and *bla*_{NDM-1} in Algiers hospitals. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(6), 438-446.
- 203. De Francesco, M. A., Ravizzola, G., Peroni, L., Bonfanti, C., Manca, N.** (2013). Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in an Italian hospital. *Journal of infection and public health*, 6(3), 179-185.

- 204. Al Bayssari, C., Diene, S.M., Loucif, L., Gupta, S.K., Dabboussi, F., Mallat, H., 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(8), 4966-4970.
- 205. Dias, V.C., Resende, J.A., Bastos, A.N., De Andrade Bastos, L.Q., De Andrade Bastos, V.Q., Bastos, R.V., et al.** (2017). Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a Brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 23(7), 852-863.
- 206. Dali, A.A.** (2015). Infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adultes a l'EHUO: Profile épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques. [Thèse]. Université d'Oran 1 Ahmed BENBELLA (Algérie).
- 207. Al Johani, S.M., Akhter, J., Balkhy, H., El-Saed, A., Younan, M., Memish, Z.** (2010). Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. *Annals of Saudi medicine*, 30(5), 364-369.
- 208. Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., Rolain, J.M.** (2014). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 156-161.
- 209. Aggoune, N., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Benamrouche, N., Naim, M., Rahal, K.** (2014). Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 327-329.
- 210. Kieffer, N., Ahmed, M.O., Elramalli, A.K., Daw, M.A., Poirel, L., Álvarez, R., Nordmann, P.** (2018). Colistin-resistant carbapenemase-producing isolates among *Klebsiella spp.* and *Acinetobacter baumannii* in Tripoli, Libya. *Journal of global antimicrobial resistance*, 13, 37-39.

211. Al-Agamy, M. H., Khalaf, N. G., Tawfick, M. M., Shibl, A. M., El Kholy, A. (2014). Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *International Journal of Infectious Diseases*, 22, 49-54.
212. Lin, K.Y., Lauderdale, T.L., Wang, J.T., Chang, S.C. (2016). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), 52-59.
213. Cho, H.H., Kwon, K.C., Kim, S., Koo, S.H. (2014). Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of laboratory medicine*, 34(4), 286.
214. Mansouri, S., Razavi, M., Norouzi, F., Gholamhoseinian, N.S. (2012). Prevalence of β -Lactamase production and antimicrobial susceptibility of multidrug resistant clinical isolates of non-fermenting Gram negative bacteria from hospitalized patients in Kerman/Iran.
215. Dundar, D., Duymaz, Z., Genc, S., Er, D.K., İrvem, A., Kandemir, N. (2018). In-vitro activities of imipenem–colistin, imipenem–tigecycline, and tigecycline–colistin combinations against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Chemotherapy*, 30(6-8), 342-347.
216. Yang, H., Chen, G., Hu, L., Liu, Y., Cheng, J., Ye, Y., Li, J. (2018). Enhanced efficacy of imipenem-colistin combination therapy against multiple-drug-resistant *Enterobacter cloacae*: in vitro activity and a *Galleria mellonella* model. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 51(1), 70-75.
217. Daoud, Z., Mansour, N., Masri, K. (2013). Synergistic combination of carbapenems and colistin against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. *Open Journal of Medical Microbiology*, 2013.
218. Herrmann, G., Yang, L., Wu, H., Song, Z., Wang, H., Hoiby, N., et al. (2010). Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of infectious diseases*, 202(10), 1585-1592.

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'identification de prélèvement

Service :

Date : /...../.....

Non et prénom :

Age :

Sex :

Site et Type de prélèvement :

Date d'hospitalisation :

Historique hospitalier :

Diagnostique à l'entrée à l'hôpital
:

Diagnostique du jour de prélèvement :..... Traitement en cours
:

Annexe 2: Tableau de lecture de la galerie API 20E (Bio-Mérieux).

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phényle-Galactoside	Béta- galactosidase	Incolore	Jaune (1)
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé (2)
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé (2)
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé (2)
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert (3)
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé (2)
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge (5)
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase		Production de NO2	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
Tube GLU	Potassium nitrate	Réduction au stade N2	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 heures d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Annexe 3: Tableau de Lecture de la galerie API 20 NE (Bio-Mérieux)

Tests	Composants actifs	Réaction/enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Potassium nitrate	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2/ 5 min	
			Incolore	Rose-rouge
		réduction des nitrates en azote	Zn/ 5min	
			Rose	incolore
TRP	L-tryptophane	formation d'indole	Kovacs/ immédiat	
			Incolore	Rose
			Vert pâle/ jaune	
GLU	D-glucose	fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	arginine Dihydrolase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/ rose/ rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (β -glucosidase)	Jaune	Gris/ marron/ noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse de la gélatine (protéase)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune
GLU	D-glucose	Assimilation	transparente	Trouble
ARA	L-arabinose	Assimilation	transparente	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation	transparente	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation	transparente	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparente	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation	transparente	Trouble
GNT	Potassium gluconate	Assimilation	transparente	Trouble
CAP	Acide caprique	Assimilation	transparente	Trouble
ADI	Acide adipique	Assimilation	transparente	Trouble
MLT	Acide malique	Assimilation	transparente	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Assimilation	transparente	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	assimilation	transparente	Trouble

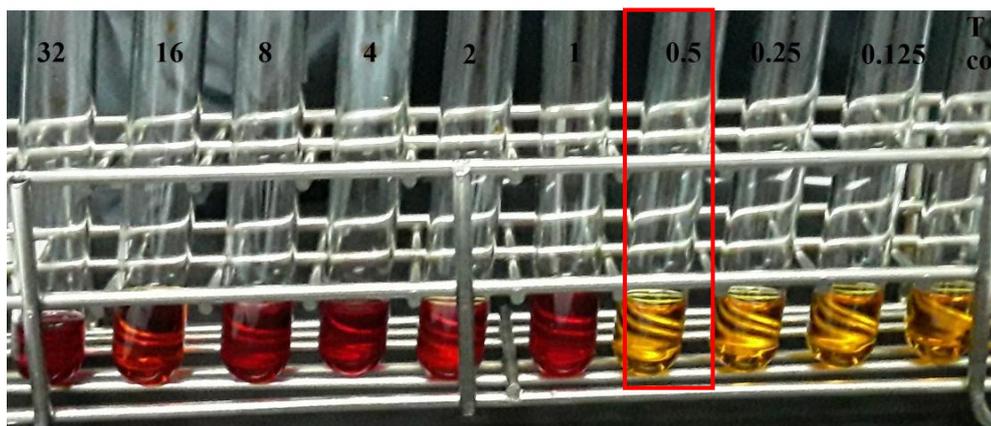
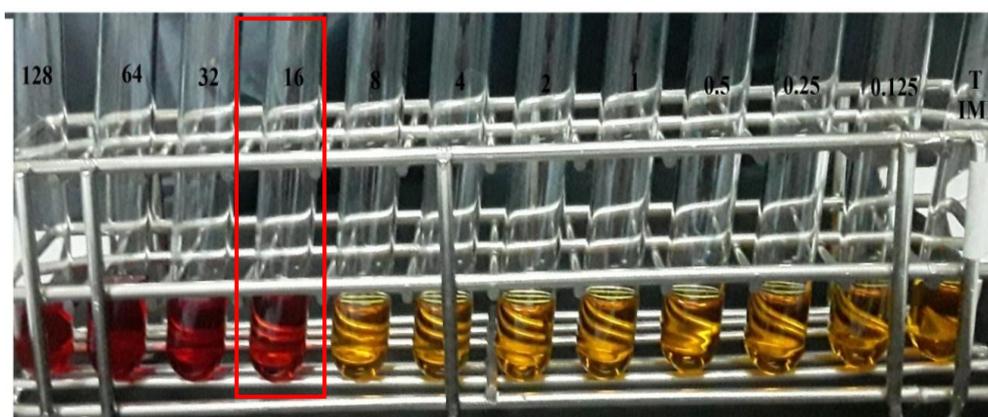
Annexe 4 : CMI des souches entérobactéries multirésistantes**Image 1:** CMI de la colistine de la souche *K. pneumoniae* N°12**Image 2:** CMI de l'imipénème de la souche *E. coli* N°9**Image 3:** CMI de l'amikacine de la souche *E. coli* N°24



Image 4: CMI de la ciprofloxacine de la souche *E.coli* N°3

Annexe 5 : CMI des souches BGN-NF multirésistantes

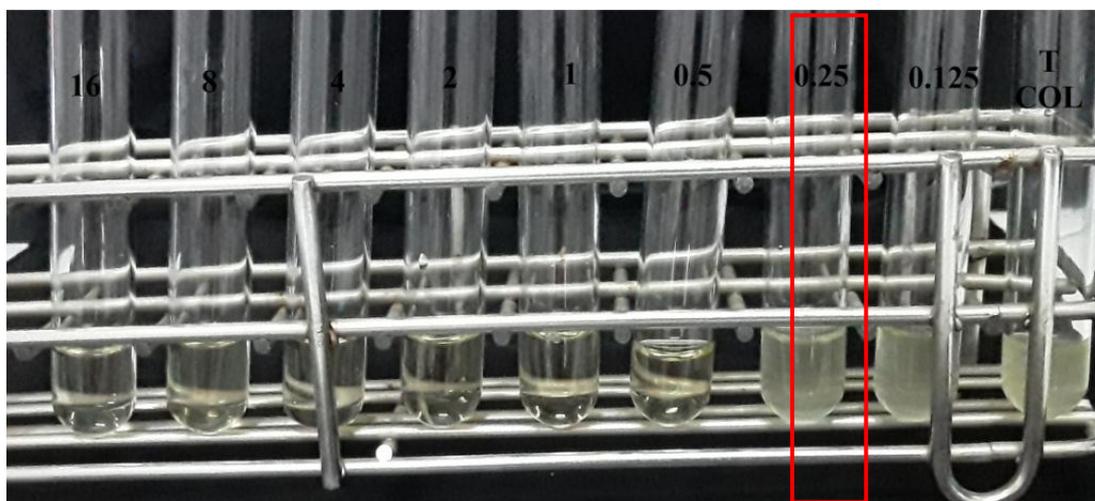


Image 6: CMI de la colistine de la souche *A.baumannii* N°7

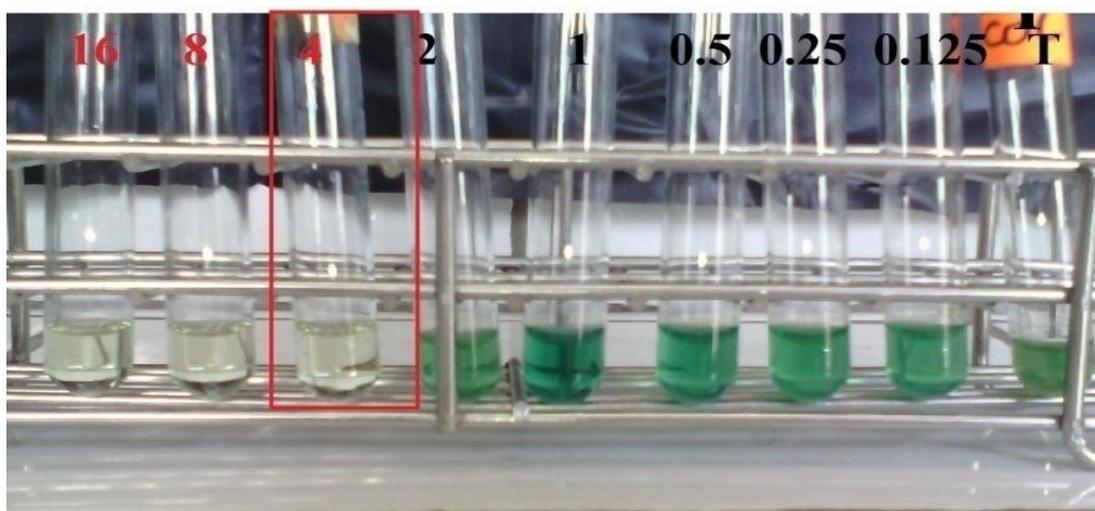


Image 7: CMI de la colistine la souche *P. aeruginosa* N°14

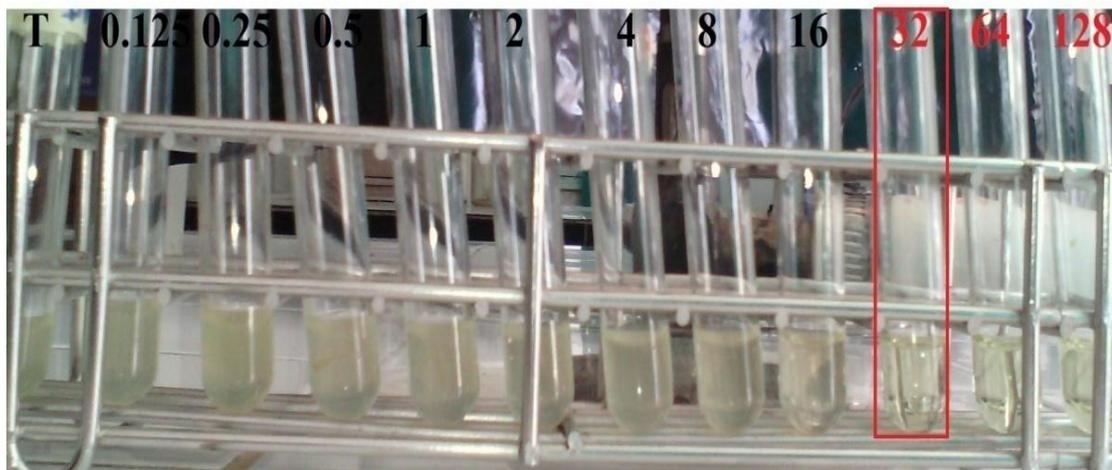


Image 8: CMI de l'imipénème la souche *A.baumannii* N°13

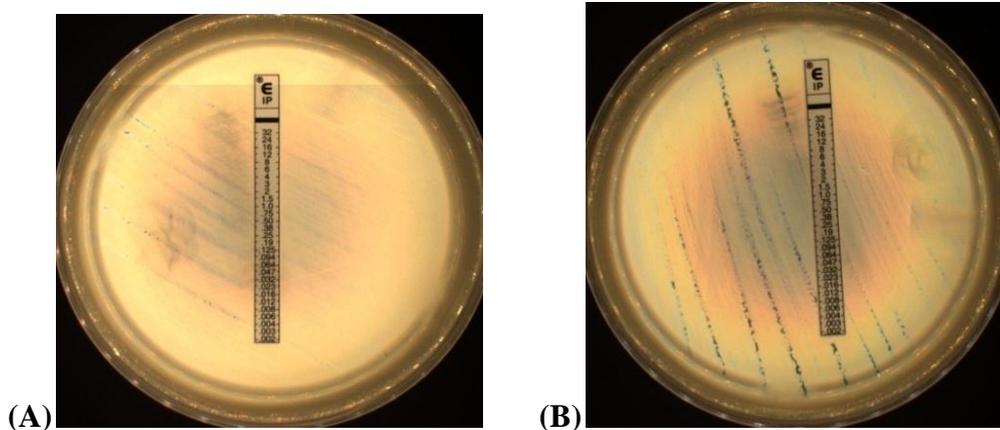


Image 9: CMI de l'imipénème d'*A.baumannii* multiresistant par E-test

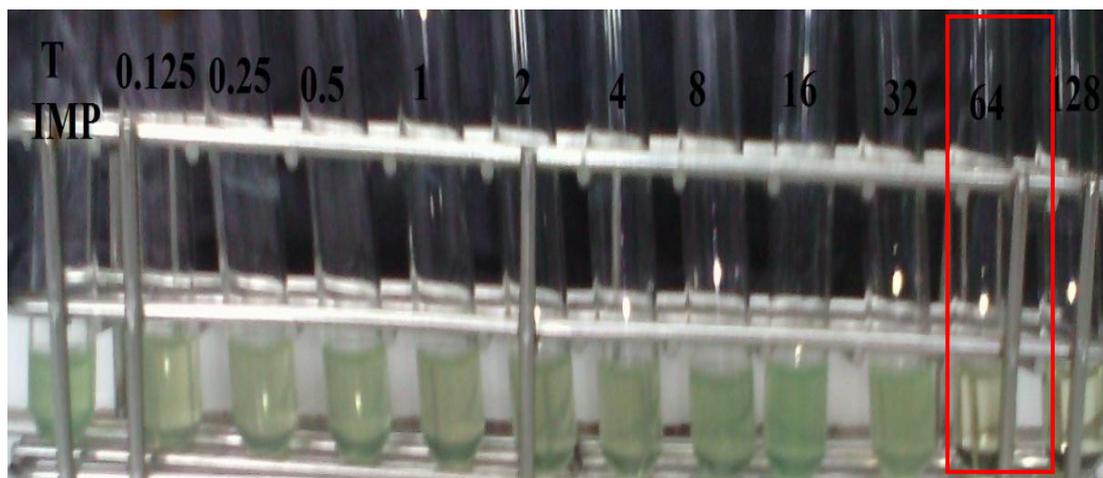
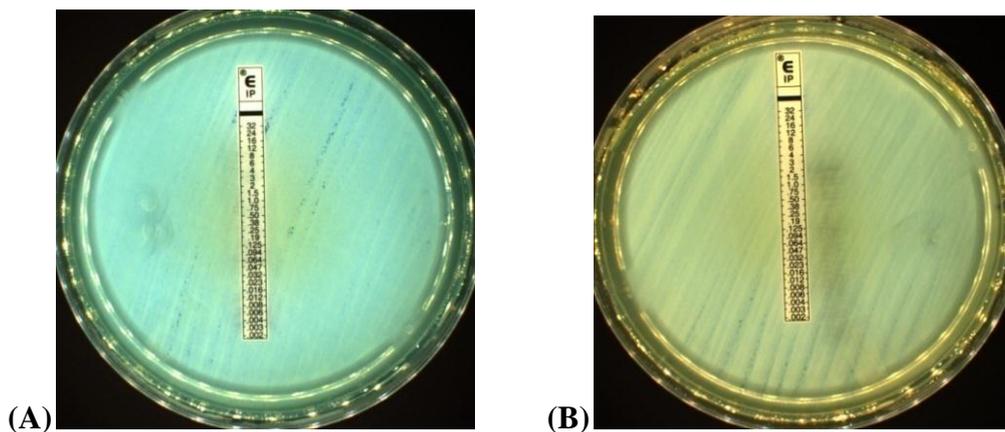


Figure 10: CMI de l'imipénème la souche *P.aeruginosa* N°33



(A) (B)
Image 11: CMI de l'imipénème de *P.aeruginosa* multiresistant par E-test

Annexe 6 : CMI d'association à base de colistine sur des BGN multirésistants



Image 12: Association synergique de la colistine avec l'amikacine sur *E.coli* N°10

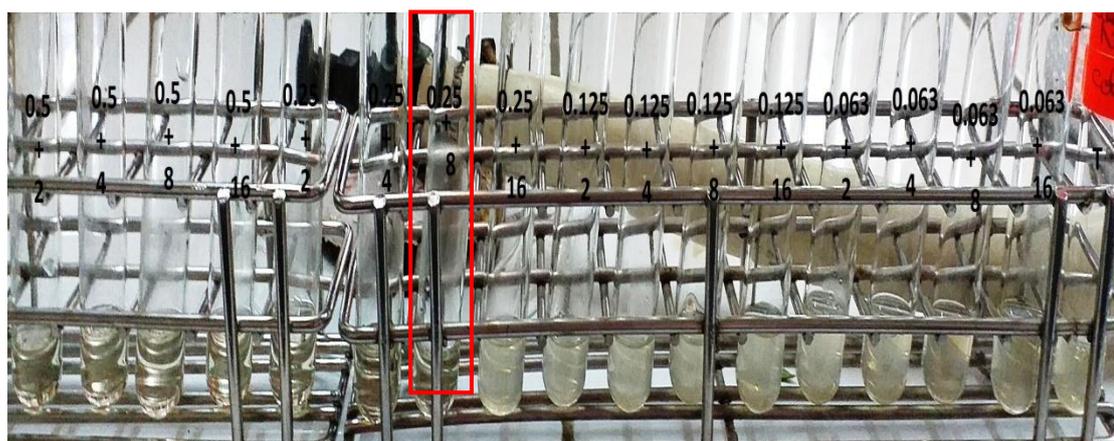


Image 13: Association synergique de la colistine avec l'imipénème sur *A. baumannii* N° 10

Synergistic combination of colistin with imipenem, amikacin or ciprofloxacin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in Annaba hospital Algeria

SAIDA MELIANI¹; SOUMAYA TOUMI¹; HEYTHEM DJAHOUDI²; KHALED DEGHDGH³; KAMEL AMOURA⁴; ABDELGHANI DJAHOUDI^{5,*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Laboratory of Microbiology, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

² Department of Biochemistry, Eco-biology Laboratory for Marine and Coastal Areas, Faculty of Sciences, BP 12 El-Hadjar, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

³ Faculty of Medicine, Pulmonology Service Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁴ Faculty of Medicine, CHU Annaba, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁵ Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Laboratory of Microbiology, Badji Mokhtar University, Annaba, BP 205, Algeria

Key words: Carbapenemases, Colistin, Combination, GNB-NF, Sub-inhibitory concentration

Abstract: Objective: The aim of this study is to detect in vitro the synergetic activity of colistin in combination with imipenem, amikacin or ciprofloxacin, at sub-inhibitory concentrations, against carbapenems-resistant (CR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various wards in Annaba teaching hospital in eastern Algeria.

Materials and Methods: The minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by broth macrodilution (BMD). Carbapenemase encoding genes were screened using polymerase chain reaction (PCR). The activity of colistin in combination with second antibiotic was evaluated by the Checkerboard Technique.

Results: 39 CR *P. aeruginosa* and 21 CR *A. baumannii* strains were collected. The MIC values ranging from (0.25 to 4 µg/ml) to colistin, ≥16 µg/ml for imipenem, ≥4 µg/ml to amikacin and ≥8 µg/ml ciprofloxacin. The PCR reveals the presence of the genes *bla_{OXA23}* (n = 12), *bla_{OXA24}* (n = 6), *bla_{NDM1}* (n = 3) in *A. baumannii* and *bla_{VIM2}* (n = 12) in *P. aeruginosa*. The combination of colistin with imipenem showed synergistic effect on 57.14% and 46.15% of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates, respectively. For colistin and amikacin, the synergistic effect is detected in 28.6% of *A. baumannii* and 30.8% of *P. aeruginosa*. While colistin and ciprofloxacin showed synergy on 14.29% and 15.38% of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates, respectively.

Conclusion: CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa* remain the most prevalent infection agents in patients from high-risk wards at Annaba Hospital. Colistin associated with imipenem or with amikacin at sub-inhibitory concentrations gives very encouraging results allowing better management of infections caused by this type of bacteria.

Introduction

Non-fermenting Gram negative bacilli such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are pathogens emerging as frequent causes of nosocomial infections, such as pneumonia, septicemia, skin, wound and urinary tract infections, with mortality rates of 18% to 61% in critically ill patients (Mohanty *et al.*, 2013; Mathlouthi *et al.*, 2015).

The treatment of these infections is often difficult because of the natural and acquired resistance of these

organisms to multiple classes of antibiotics, essentially extended-spectrum cephalosporins, aminoglycosides, and fluoroquinolones. This is what severely limits therapeutic options (Mohanty *et al.*, 2013). Carbapenems have been often used as treatment for infections caused by these multidrug-resistant (MDR) bacteria.

However, in recent years this situation has changed, with the emergence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli (GNB), reported from different regions of the world, including mediterranean countries (Mellouk *et al.*, 2017).

The most common mechanism of resistance is the acquisition of genes encoding for carbapenemases particularly, Metallo-β-lactamases (MBLs) in *P. aeruginosa* such as VIM, IMP, GIM, FIM, and SPM. The *bla_{VIM-2}* gene is the dominant Metallo-β-lactamase in all over the world (Toumi *et al.*, 2018). In Algeria, this gene was reported in

*Address correspondence to: Abdelghani Djahoudi, adjahoudi@yahoo.fr

Received: 11 November 2019; Accepted: 16 December 2019

Annaba, and Oran (Toumi *et al.*, 2018; Touati *et al.*, 2013; Sefraoui *et al.*, 2014).

For *A. baumannii* carbapenem resistance is mostly associated with oxacillinases, especially OXA-23, OXA-24, OXA-58, which have a higher dissemination worldwide, including African countries. Resistance by NDM-1 is also increasingly reported (Mathlouthi *et al.*, 2015). In Algeria, several studies describe these enzymes in *A. baumannii* strains isolated in Annaba (Touati *et al.*, 2012; Mellouk *et al.*, 2017; Toumi *et al.*, 2018). Setif, Tizi-Ouzou (Bakour *et al.*, 2012), Tlemcen, Sidi Bel Abbes, Oran (Mesli *et al.*, 2013), Algiers and Bejaia (Bakour *et al.*, 2014).

The colistin, is a polypeptide antibiotic of the group E polymyxin family. It exhibits rapid and concentration-dependent bactericidal activity by destroying the outer membrane of Gram-negative bacteria (Kipnis and Guery, 2010). This antibiotic has been used in recent years as an alternative to the treatment of MDR BGN, such as CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. However, resistances to colistin have been reported recently in all across the globe (Ahmed *et al.*, 2016). With limited therapeutic options, clinicians are increasingly forced to turn to combination of antibiotics in the hope that these may be efficacious against these MDR bacteria. Many colistin-based combinations were tested have been shown synergistic activity *in vitro* (Wareham *et al.*, 2011). These synergies could prevent the emergence of resistant strains and also use lower doses of colistin, reducing its toxicity (Daoud *et al.*, 2013).

The aim of the present study is to search *in vitro* the synergetic activity of colistin in combination at sub-active concentrations with antibiotics usually used as first-line drugs in Algeria such as imipenem, amikacin or ciprofloxacin against CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains isolated from various wards in Annaba teaching hospital in eastern Algeria.

Materials and Methods

Bacterial isolates

A total of 60 strains *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* CR were collected on 240 non-fermenting Gram-negative bacilli (NF-GNB) made responsible for infections during the period from September 2015 and April 2017. These strains were isolated from not redundant 900 pathological specimens: distal protected sampling (DPS), pus and urine taken from patients hospitalized in the various departments (intensive care units, burns units, endocrinology and urology) at Annaba hospital-Algeria. The isolates were identified using API 20NE galleries (Bio-Mérieux), and confirmed by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Seng *et al.*, 2009).

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility to was determined for thirteen antibiotics using the Muller-Hinton (MH) agar diffusion method, according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018).

Phenotypic and genotypic characterization produced carbapenemases

All the isolates resistant to imipenem were subjected to modified Hodge test (MHT) as was described by CLSI. A dilute suspension of 1/10 of *E. coli* ATCC 25922 (0.5 Mc Farland) was prepared and inoculated the surfaces of MH agar plates. An imipenem disk (10 µg) is placed in the center to the plate. Test organism was streaked in a straight line from the edge of the disk to the edge of the plate. The plate was incubated for 18 hours at 35°C. The MHT was interpreted as positive based on the presence of a distorted inhibition zone between of the strain tested, and the culture of *E. coli* (Toumi *et al.*, 2018).

The detection of MBL was also performed by the EDTA test (Toumi *et al.*, 2018). Two imipenem discs (10 µg), deposit with 25 mm one of the other, one containing 10 µl of EDTA (solution 0.5 M, pH = 8). After 18 hours of incubation at 35°C, the diameters of inhibition zones around the disks are measured and compared. An increase superiors 6 mm in the zone diameter around the imipenem-EDTA disc compared with that of the imipenem disc alone was considered as positive for MBL production.

The search for genes encoding for carbapenemases (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}) was realized by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) and standard PCR, using starters and probes specific to various reference strains. The amplified PCR obtained products have been sequenced using Big Dye terminator chemistry on an ABI 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed using the ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) (Gupta *et al.*, 2014).

Determination of the minimal inhibitory concentrations (MICs)

The MICs of colistin, imipenem, ciprofloxacin and amikacin were determined by broth macrodilution according to the recommendations of CLSI (Rahal, 2011). Antibiotic stock solutions are prepared in sterile distilled water at a concentration of 1024 µg/ml. Thus semi-logarithmic dilutions of reason 2 can be made to obtain concentrations ranging from 512 µg/ml to 0.063 µg/ml. In parallel bacterial suspensions are prepared at densities of 0.5 MF (10⁸ CFU/ml). Then, they are diluted to 1/10th. Inoculation is carried out by culturing 50 µl of the bacterial suspension in 700 µl of cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) at which 250 µl of the antibiotic at given concentration is added. One control tube of culture without antibiotic and another without inoculums are included in the study. All the prepared tubes are incubated for 18 hours at 35°C. The MIC corresponds to the first tube without bacterial growth visible to the naked eye. Two reference strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 25953) used for quality control is tested under the same conditions.

Type of colistin based combination activity

The activity of colistin based combination was determined by broth macrodilution checkerboard method (Humphries, 2016). In 700 µl of CAMHB we add 50 µl of the 0.5 MF

bacterial suspension diluted 1/10. Then we add 125 µl of each stock solution of the two associated antibiotics prepared in a checkerboard configuration at adequate concentration. *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 25953 are used for quality control.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) for each of the three combinations was calculated according to the following formula: $FICI = FICI A + FICI B$, $FICI A = MIC \text{ of drug A in combination} / MIC \text{ of drug A alone}$, and $FICI B = MIC \text{ of drug B in combination} / MIC \text{ of drug B alone}$.

The FICI results for each combination were interpreted as follows: synergistic ($FICI \leq 0.5$); indifferent $0.5 < FICI \leq 4$; antagonistic ($FICI > 4$) (Pillai *et al.*, 2005).

Results

A total of 240 strains of NF-GNB responsible for infections were isolated from 900 non-redundant pathological samples. Among them 60 strains (25%) showed resistance to imipenem and met the BMR criterion. These carbapenem-resistant strains are derived mainly from pus ($n = 44$; 73.33%), urine ($n = 9$; 15%), site of operation ($n = 9$; 10%), and PPD ($n = 3$; 5%) *P. aeruginosa* predominated with 39 strains (65%) followed by *A. baumannii* ($n = 21$; 35%) (Tab. 1).

All CR *A. baumannii* strains are fully resistant to ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, aztreonam, ceftazidime, cefepime, cefotaxime, gentamicin

and tobramycin (Fig. 1). It produces carbapenemases and only three strain posses MBL revealed by the EDTA. The detection of the genes of resistance to carbapenem permits to highlight 12 (57.14%) genes *bla*_{OXA-23}, 6 (28.57%) *bla*_{OXA-24} and 3(14.29%) *bla*_{NDM-1} (Tab. 2). The MICs values are high for imipenem and ciprofloxacin, ranging from 16 to 32 µg/ml and 16 to 128 µg/ml, respectively (Figs. 2 and 3). While for amikacin the MIC ≥ 8 µg/ml and for colistin is ranging from 0.25 to 2 µg/ml (Figs. 4 and 5).

The situation is different for CR *P. aeruginosa* strains, it show less resistance to ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid and ceftazidime (61.5%), piperacillin/tazobactam (46.2%), cefepime and aztreonam (76.92%), cefotaxime (100%), gentamicin (100%), tobramycin (69.23%) (Fig. 1). Twelve (30.77%) strains produce carbapenemases that have been shown to be MBL. Four CR *P. aeruginosa* strains possess the *bla*_{VIM-2} gene (Tab. 2).

For the remaining strains, carbapenem resistance may be the result of a type OprD mutation or the presence of an efflux pump. The absolute values of MICs of the imipenem vary within a range of 16 to 128 µg/ml (Fig. 2). Ciprofloxacin and Amikacin exhibit MICs ≥ 8 µg/ml and ≥ 4 µg/ml, respectively (Figs. 3 and 4). Colistin which remains active shows MICs ranging from 1 to 4 µg/ml (Fig. 5).

The results of the activity of different colistin-based combinations on CR *A. baumannii* showed a synergy rate of the order of 57.14% when it is associated with imipenem.

TABLE 1

Distribution of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains related to clinical characteristics of patients

Parameter	Carbapenem-resistant bacteria	
	<i>A. baumannii</i> (n = 21)	<i>P. aeruginosa</i> (n = 39)
Gender, n (%)		
Male	15 (71.43)	24 (61.54)
Female	6 (28.57)	15 (38.46)
Source: n (%)		
Pus	15 (71.43)	30 (76.92)
Urine	3 (14.29)	3 (7.69)
PPD	00	3 (7.69)
Operative sites	3 (14.29)	3 (7.69)
Service, n (%)		
Intensive care unit	00	6 (15.38)
Burns	3 (14.29)	24 (61.54)
Endocrinology	12 (57.14)	3 (7.69)
Urology	6 (28.57)	6 (15.38)
Previous use of antimicrobials, n (%)		
Cefotaxime	3(14.29)	9 (23.08)
Imipenem	8 (38.09)	16 (41.03)
Amikacin	3 (14.29)	5 (12.82)
Ciprofloxacin	4 (19.04)	9 (23.08)
Imipenem + Amikacin	3 (14.29)	00

Note: DPS = distal protected sampling; C3G = third-generation cephalosporin.

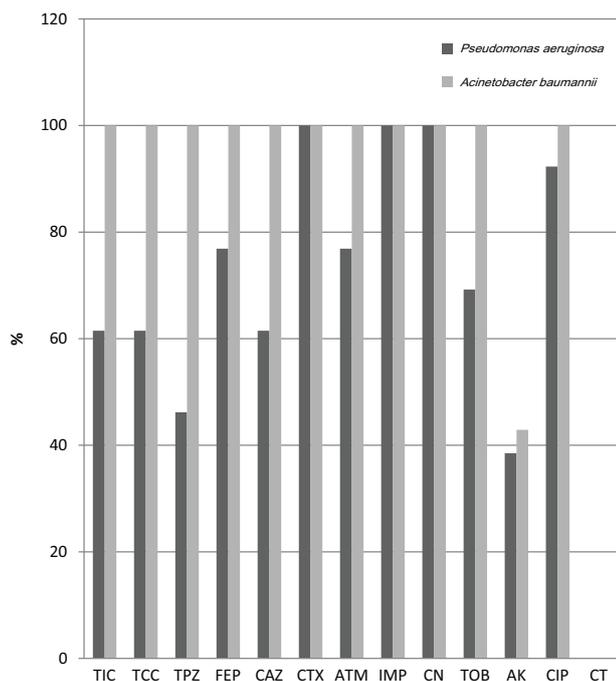


FIGURE 1. Antibiotic susceptibility of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical strains.

TIC = ticarcillin; TCC = ticarcillin/clavulanic acid; TPZ = piperacillin/tazobactam; FEP = cefepime; CAZ = ceftazidime; CTX = cefotaxime; ATM = aztreonam; IMP = imipenem; CN = gentamicin; TOB = tobramycin; AK = amikacin; CIP = ciprofloxacin; CT = colistin.

TABLE 2

Genotypic characterization by PCR of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains

Isolates		<i>bla</i> genes				Total
		Class B		Class D		
		<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	
<i>A. baumannii</i>	N	0	3	12	6	21
	(%)	0	(14.29)	(57.14)	(28.57)	(100)
<i>P. aeruginosa</i>	N	12	0	Nd.	Nd.	12
	(%)	(30.77)	0	Nd.	Nd.	(30.77)

Note: N = number of isolats; Nd = not determined.

More preferably, the concentrations required for this synergistic activity range from 0.25 to 0.5 µg/ml for colistin and from 2 to 8 µg/ml for the imipenem. On these same strains, the combination of colistin with amikacin also gives encouraging results with a synergistic effect up to 42.86% at sub-inhibitory concentrations of 0.25 µg/ml for colistin and from 1 to 4 µg/ml for amikacin. While the combination of colistin with ciprofloxacin is indifferent type for most strains (85.71%). In this case the synergistic effect was observed in only three strains (14.29%) at sub-inhibitory concentrations of 0.25 µg/ml for colistin and 4 µg/ml for ciprofloxacin (Tab. 3).

For CR *P. aeruginosa* strains, the combination of colistin with imipenem acts synergistically at 46.15% at sub-inhibitory concentrations ranging from 0.25 to 1 µg/ml for colistin and from 4 to 8 µg/ml for imipenem. However, the combination of colistin with amikacin shows a synergistic effect of 30.77% at sub-inhibitory concentrations ranging from 0.5 to 1 µg/ml for colistin and from 4 µg/ml for amikacin. A weak synergistic effect (15.38%) is observed for the combination of colistin with ciprofloxacin at sub-inhibitory concentrations ranging

from 0.25 to 1 µg/ml for colistin and from 4 to 8 µg/ml for ciprofloxacin, while 84.62% of isolates have an indifferent effect. It should be noted that no antagonistic effect was observed for the three combinations tested on both CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains (Tab. 3).

Discussion

Like many other regions of the world, Algeria has experienced a worrying emergence of carbapenem resistance in recent years, particularly among GNBs such as *A. baumannii* and *P. aeruginosa* (Bakour et al., 2014). This phenomenon is a major public health problem, given that these molecules are often the only effective treatment against these particularly multiresistant microorganisms (Mellouk et al., 2017). In our study, the resistance rate to imipenem of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* tested strains is very high with MIC values ranging from 16 to 128 µg/ml. They all have an MDR profile and 55% of them produce carbapenemases.

They are all susceptible to colistin with MIC values ranging from 0.25 to 2 µg/ml for CR *A. baumannii* and

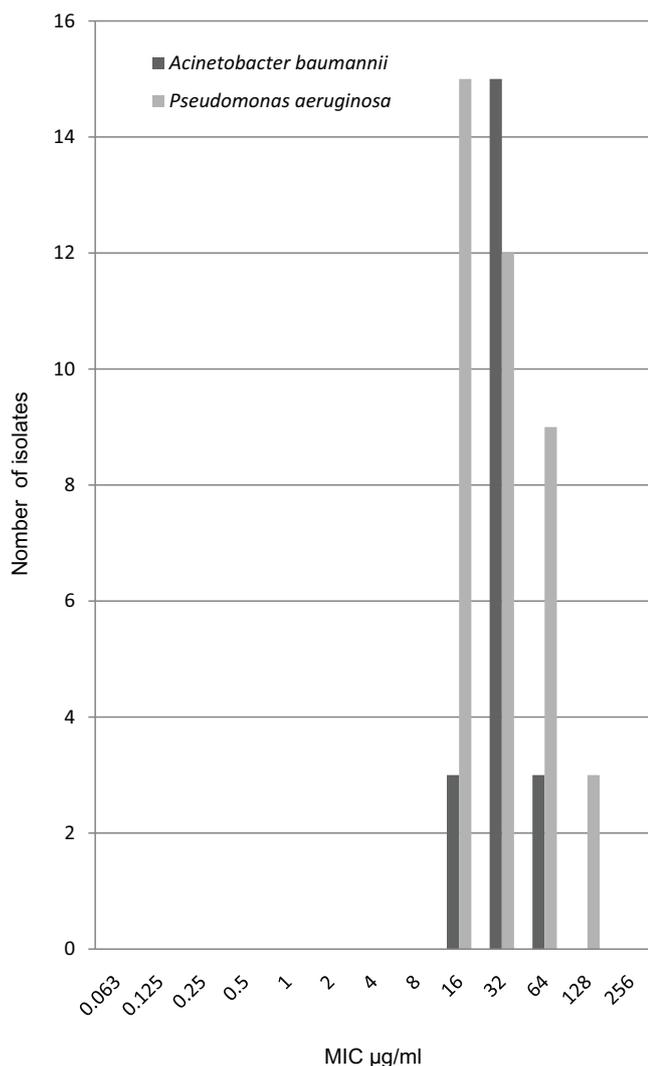


FIGURE 2. MIC of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates to imipenem.

from 1 to 4 µg/ml for CR *P. aeruginosa*. This molecule is a last resort therapeutic option to fight against these strains. However, in recent years they acquired a growing resistance in addition to its toxicity, which leads to many therapeutic failures (Ahmed *et al.*, 2016).

Previous, *in vitro* studies have shown that the combination of the colistin with carbapenems has good antibacterial activity on GNB especially on *A. baumannii* because it presents high rates of synergy and bactericidal activity with a less antagonism and less development of resistance. Zusman *et al.* (2013) showed that the synergy rate of the colistin-carbapenems combination is >80% for *A. baumannii* and >60% for *P. aeruginosa*. Ramadan *et al.* (2018) describes similar results for this type of combination where the rate of synergy was 83.3% and 63.6% for CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, respectively.

Our results showed that colistin associated with imipenem is the most active combination on carbapenem resistant *A. baumannii* (57.14%) and *P. aeruginosa* (46.15%) strains. In addition there is a significant decrease in the MIC of the imipenem. The synergy is obtained especially at a modal sub-inhibitory concentration of colistin of 0.5 µg/ml associated with a modal sub-inhibitory concentration of the

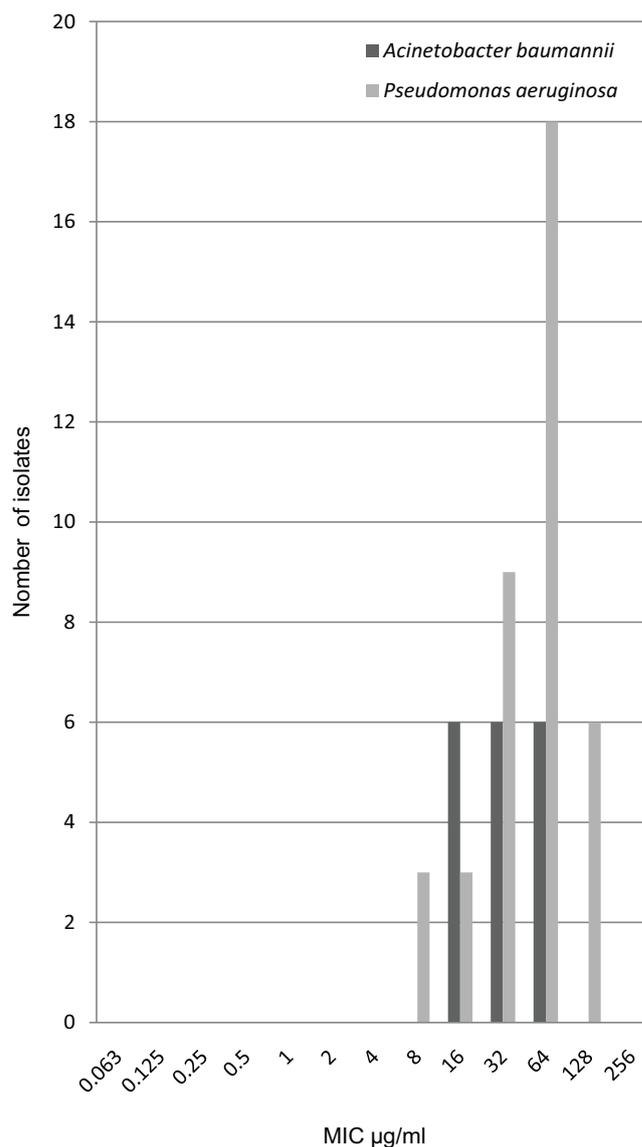


FIGURE 3. MIC of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates to ciprofloxacin.

imipenem of 8 µg/ml. This situation is observed mainly in *A. baumannii* producer strains of oxacillinase *bla*_{OXA-23}. These strains are isolated from diabetic patients under antimicrobial therapy based on imipenem and/or amikacin, cefotaxime.

On the other hand, in *P. aeruginosa* strains, synergistic activity is observed mainly in imipenem resistant strains with no production of carbapenemases. The modal sub-inhibitory concentrations of colistin and imipenem are equal to 0.25 µg/ml and 8 µg/ml, respectively. The majority of these strains are isolated from pus samples in patients hospitalized in the service of large burns antibiotics based on imipenem or amikacin.

This improvement may be due to the destabilization action of the outer membrane of GNB by colistin facilitating membrane permeability and increasing the intracellular concentrations of imipenem. Thus, it enlarges the possibilities of treatment and especially overcome the issue of resistance carbapenems and decreased the risk of colistin toxicity (Daoud *et al.*, 2013).

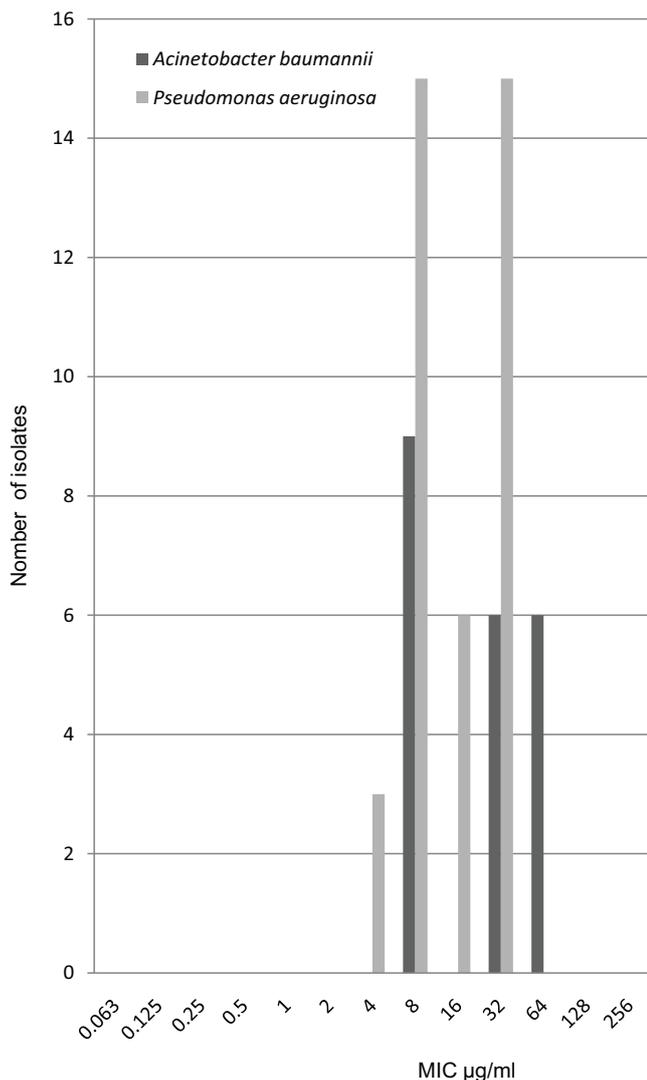


FIGURE 4. MIC of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates to amikacin.

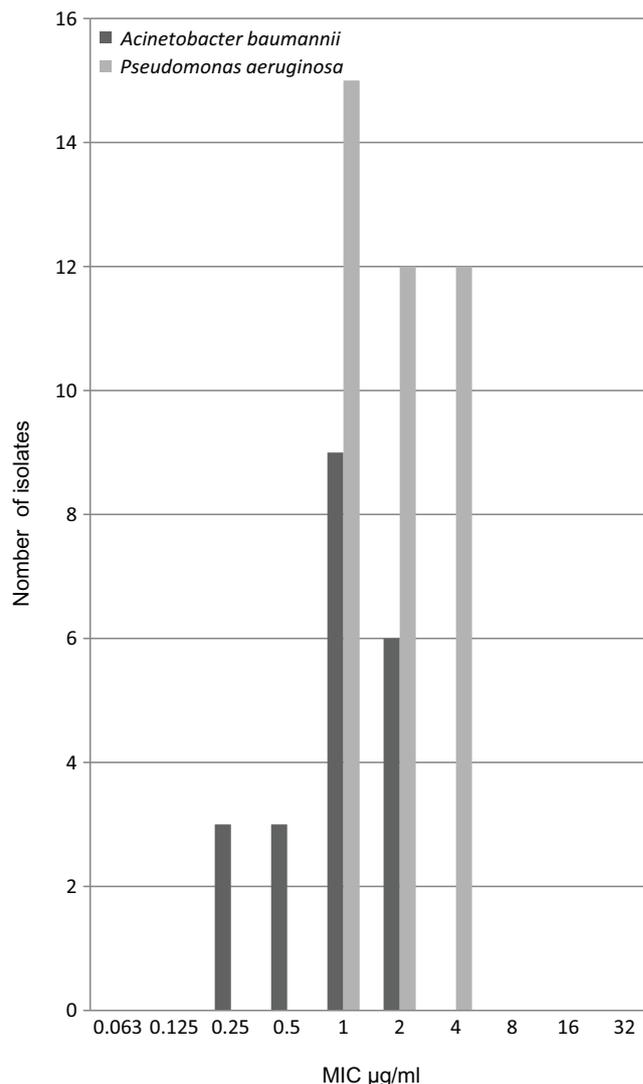


FIGURE 5. MIC of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates to colistin.

In therapeutic practice the combination of colistin with amikacin is not recommended because of the toxicity of both antibacterial families (Martis *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017). However this combination allowed the treatment of meningitis caused by *A. baumannii* MDR (Fulnecky *et al.*, 2005). The same result is reported by in vitro and in vivo studies on strains of *P. aeruginosa* MDR (Tascini *et al.*, 2000). In this study, we recorded an encouraging synergistic effect of around 42.86% and 30.77% on CR *A. baumannii*

and *P. aeruginosa* strains, respectively. Note that the synergy detected at modal sub-inhibitory concentrations of colistin is amikacin equal to 0.25 µg/ml and 4 µg/ml respectively, for strains of *A. baumannii* producing *bla*_{OXA-23}. While for *P. aeruginosa*, only strains harbouring *bla*_{VIM-2} show synergy at modal sub-inhibitory concentrations of 0.5 µg/ml and 4 µg/ml for colistin and amikacin, respectively.

The combination of colistin with ciprofloxacin is poorly documented and the available data show variable results

TABLE 3

Activity of antimicrobial combinations against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Antimicrobial agents	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 21)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 39)		
	Synergy FICI ≥ 0.5	Indifferent 0.5 < FICI ≤ 4	Antagonism FICI > 4	Synergy FICI ≥ 0.5	Indifferent 0.5 < FICI ≤ 4	Antagonism FICI > 4
Colistin-imipenem	12 (57.14%)	9 (42.86%)	00	18 (46.15%)	21(53.85%)	00
Colistin-ciprofloxacin	3 (14.29%)	18 (85.71%)	00	6 (15.38%)	33 (84.62%)	00
Colistin-amikacin	9 (42.86%)	12 (57.14%)	00	12 (30.77%)	27 (69.23%)	00

depending on the considered species (Martis *et al.*, 2014). Thus, Rynn *et al.* (1999) and Richards and Xing (1993) report a total synergistic effect for colistin with ciprofloxacin on *P. aeruginosa* strains MDR. On the other hand, the synergistic effect of the same combination is of little importance on *A. baumannii* MDR (Kheshti *et al.*, 2019). This is shown by both CR *A. baumannii* and *P. aeruginosa* (14.29% and 15.38% respectively). Moreover, in case of synergistic effect the modal MIC is very low. This combination has an activity mostly indifferent 85.71% for CR *A. baumannii* and 84.62% for CR *P. aeruginosa*.

Although the clinical significance of our results for these combinations has not yet been determined, the combination of colistin with imipenem or with amikacin may be a therapeutic alternative to explore for the control of carbapenem-resistant NF-GNB by production of carbapenemases.

Conclusion

The results of this study allow us to say that colistin at low concentrations not only restores but also improves the antibacterial activity of imipenem or amikacin on carbapenem-resistant *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains. Such associations represent a therapeutic alternative that can contribute to the resolution of the problem of emergence and dissemination of OXA-23-type oxacillinase and metallo- β -lactamase type VIM-2-producing NF-GNB strains frequently isolated in intensive care unit in Algeria. However, additional *in vivo* investigations are needed to judge the efficacy of such combinations.

Funding Statement: The author(s) received no specific funding for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

References

- Ahmed SS, Alp E, Hopman J, Voss A (2016). Global epidemiology on colistin resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases and Therapy* 4: 1–5.
- Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait AA, Haoachine D, Sahli F, Rolain JM (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *Journal of Medical Microbiology* 61: 1341–1343. DOI 10.1099/jmm.0.045807-0.
- Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM (2014). First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20: 696–701. DOI 10.1016/j.jiac.2014.07.010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th Edition. Wayne, PA: Institut des normes cliniques et de laboratoire.
- Daoud Z, Mansour N, Masri K (2013). Synergistic combination of carbapenems and colistin against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. *Open Journal of Medical Microbiology* 3: 253–258. DOI 10.4236/ojmm.2013.34038.
- Fulnecky EJ, Wright D, Scheld WM, Kanawati L, Shoham S (2005). Amikacin and colistin for treatment of *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Journal of Infection* 51: e249–e251. DOI 10.1016/j.jinf.2005.04.003.
- Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain JM (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 212–220. DOI 10.1128/AAC.01310-13.
- Humphries RM (2016). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Leber AL, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. pp. 7–11. 4th Edition. Washington, DC: ASM Press.
- Kheshti R, Pourabbas B, Mosayebi M, Vazin A (2019). *In vitro* activity of colistin in combination with various antimicrobials against *Acinetobacter baumannii* species, a report from South Iran. *Infection and Drug Resistance* 12: 129–135. DOI 10.2147/IDR.S182585.
- Kipnis E, Guery BP (2010). Réévaluation de la colistine. *Antibiotiques* 12: 205–227. DOI 10.1016/j.antib.2010.10.003.
- Martis N, Leroy S, Blanc V (2014). Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections a narrative review for the clinician. *Journal of Infection* 69: 1–12. DOI 10.1016/j.jinf.2014.03.001.
- Mathlouthi N, Areig Z, Al Bayssari C, Bakour S, Ali El Salabi A, Ben Gwierif S, Zorgani AA, Ben Slama K, Chouchani C, Rolain JM (2015). Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some Libyan hospitals. *Microbial Drug Resistance* 21: 335–341. DOI 10.1089/mdr.2014.0235.
- Mellouk FZ, Bakour S, Meradji S, Al-Bayssari C, Bentakouk MC, Zouyed F, Djahoudi A, Boutefnouchet N, Rolain JM (2017). First detection of VIM-4- producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in north eastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance* 23: 335–344. DOI 10.1089/mdr.2016.0032.
- Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International Journal of Infectious Diseases* 17: e739–e743. DOI 10.1016/j.ijid.2013.02.024.
- Mohanty S, Maurya V, Gaiind R, Deb M (2013). Phenotypic characterization and colistin susceptibilities of carbapenem-resistant of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Journal of Infection in Developing Countries* 7: 880–887. DOI 10.3855/jidc.2924.
- Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM (2005). Antibiotics in laboratory medicine. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th Edition, Baltimore, MD: Lippincott Williams a Wilkins. pp. 365–440.
- Rahal K (2011). Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire. Document édité avec la collaboration de l'OMS. 6ème Edition.
- Ramadan RA, Gebriel MG, Kadry HM, Mosallem A (2018). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations. *Infection and Drug Resistance* 11: 1261–1269. DOI 10.2147/IDR.S170233.
- Richards RM, Xing DK (1993). Investigation of synergism between combinations of ciprofloxacin, polymyxin, sulphadiazine and p-aminobenzoic acid. *Journal of Pharmacy and*

- Pharmacology* **45**: 171–175. DOI 10.1111/j.2042-7158.1993.tb05527.x.
- Rynn C, Wootton M, Bowker KE, Alan HH, Reeves DS (1999). *In vitro* assessment of colistin's antipseudomonal antimicrobial interactions with other antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* **5**: 32–36.
- Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM (2014). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance* **20**: 156–161. DOI 10.1089/mdr.2013.0161.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* **49**: 543–551. DOI 10.1086/600885.
- Tascini C, Ferranti S, Messina F, Menichetti F (2000). *In vitro* and *in vivo* synergistic activity of colistin, rifampin, and amikacin against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Clinical Microbiology and Infection* **6**: 690–691. DOI 10.1046/j.1469-0691.2000.00169.x.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM (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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 2426–2427. DOI 10.1128/AAC.00032-13.
- Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain JM (2012). Emergence of *bla*OXA-23 and *bla*OXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **40**: 89–91. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2012.03.017.
- Toumi S, Meliani S, Amoura K, Racherache A, Djebien M, Djahoudi A (2018). Multidrug-resistant Gram-negative bacilli producing oxacillinases and Metallo- β -lactamases isolated from patients in intensive care unit-Annaba hospital-Algeria (2014–2016). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **8**: 107–113.
- Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M (2011). *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin vs. multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**: 1047–1051. DOI 10.1093/jac/dkr069.
- Zhou YF, Tao MT, Feng Y, Yang RS, Liao XP, Liu YH, Sun J (2017). Increased activity of colistin in combination with amikacin against *Escherichia coli* co-producing NDM-5 and MCR-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**: 1723–1730. DOI 10.1093/jac/dkx038.
- Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M (2013). Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 5104–5111. DOI 10.1128/AAC.01230-13.