



ANNEE: 1994

N° 58

**PROFILS ELECTROPHORETIQUES
DES PLASMIDES DE RESISTANCE
AUX BETA-LACTAMINES DE SOUCHES
BACTERIENNES MULTIRESISTANTES
ISOLEES A DAKAR**

#####

T H E S E

**pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)**

**présentée et soutenue publiquement
le: 26 Juillet 1994**

par

K H A D Y S Y

Née le 13 Juin 1966 à Montpellier (France)

Président du jury :	Mr Doudou BA	: Professeur
Membres du jury :	Mr Abibou SAMB	: Professeur
	Mr Souleymane MBOUP	: Professeur
	Mr Mamadou BADIANE	: Maître de Conférence Agrégé
Directeurs de thèse:	Mr Souleymane MBOUP	: Professeur
	Mr Cheikh S.B. BOYE	: Maître Assistant



ANNEE: 1994

N° 58

**PROFILS ELECTROPHORETIQUES
DES PLASMIDES DE RESISTANCE
AUX BETA-LACTAMINES DE SOUCHES
BACTERIENNES MULTIRESISTANTES
ISOLEES A DAKAR**

#####

T H E S E

**pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)**

**présentée et soutenue publiquement
le 26 Juillet 1994**

par

K H A D Y S Y

Née le 13 Juin 1966 à Montpellier (France)

Président du jury :	Mr Doudou BA	: Professeur
Membres du jury :	Mr Abibou SAMB	: Professeur
	Mr Souleymane MBOUP	: Professeur
	Mr Mamadou BADIANE	: Maître de Conférence Agrégé
Directeurs de thèse:	Mr Souleymane MBOUP	: Professeur
	Mr Cheikh S.B. BOYE	: Maître Assistant

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN.....	M. René	NDOYE
PREMIER ASSESSEUR.....	M. Doudou	BA
DEUXIEME ASSESSEUR.....	M. Ibrahima Pierre	NDIAYE
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS.....	M. Assane	CISSE

PROFESSEURS TITULAIRES

☆☆☆

M. Doudou	BA	Chimie analytique
M. Ibrahima	BA	Pédodontie-Prévention
M. Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	BAO	Médecine Interne I
M. Fallou	CISSE	Physiologie
M. Marc	DAIRE	Physique Pharmaceutique
M. Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
M. Lamine	DIAKHATE	Hématologie
M. Samba	DIALLO	Parasitologie
M. Adrien	DIOP	Chirurgie Générale
M. El Hadj Malick	DIOP	O. R. L.
Mme Thérèse MOREIRA	DIOP	Médecine Interne I
M. Sékou	DIOUF	Cardiologie
M. Mohamadou	FALL	Pédiatrie
M. Mamadou	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M. Nicolas	KUAKUVI	Pédiatrie
M. Pierre	LAMOUCHE	Radiologie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
M. Aristide	MENSAH	Urologie
M. Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M. Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
M. Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
Mme Ndiro	NDIAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Papa Demba	NDIAYE	Anatomie Pathologique
M. Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M. René	NDOYE	Biophysique
M. Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie
M. Abdou	SANOKHO	Pédiatrie (Détachement)
Mme Awa Marie COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M. Ibrahima	SECK	Biochimie Médicale
M. Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale
M. Abdourahmane	SOW	Maladies Infectieuses (Détachement)
M. Ahmédou Moustapha	SOW	Médecine Interne II
Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
M. Moussa Lamine	SOW	Anatomie
M. Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M. Papa	TOURE	Cancérologie
M. Alassane	WADE	Ophthalmologie
M. Ibrahima	WONE	Médecine Préventive

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

☆ ★ ☆

M. José-Marie	AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M. Mamadou	BA	Pédiatrie
M. Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M. Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
M. Mamadou Diakhité	BALL	Dermatologie (Détachement)
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
M. Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
M. Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M. Babacar	DIOP	Psychiatrie
M. El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Saïd Norou	DIOP	Médecine Interne II
M. Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M. Babacar	FAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
Mme Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
M. Momar	GUEYE	Psychiatrie
M. Abdoul Almamy	HANE	Pneumophisiologie
M. Salvy Léandre	MARTIN	Anatomie pathologique
M. Madoune Robert	NDIAYE	Ophthalmologie
Mme Mbayang	NDIAYE NIANG	Physiologie
M. Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie générale
Mme Bincta	SALL KA	Anesthésiologie-Réanimation
M. Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M. Omar	SYLLA	Psychiatrie
M. Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale
M. Omar	NDIR	Parasitologie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

☆ ★ ☆

M. Moustapha	SARR	Cardiologie
M. Jean Pierre	BENAIS	Médecine Légale
M. Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie

MAITRES-ASSITANTS

☆ ★ ☆

M. Mamadou	BA	Urologie
M. Moussa	BADIANE	Radiologie
M. El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Michel	DEVELOUX	Dermatologie
M. Abdarahmane	DIA	Anatomie
M. Massar	DIAGNE	Neurologie
M. Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M. Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
M. Raymond	DIOUF	O. R. L.
M. Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M. Ibrahima	Fall	Chirurgie Générale
Mme Mamé Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	GAYE	Parasitologie
M. Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie
M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Jean-Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
M. Adama Bandiougou	NDIAYE	Immunologie (Hématologie)
M. Papa Amadou	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Niama Diop	SALL	Biochimie Médicale
M. Gora	SECK	Physiologie
Mme. Haby	SIGNATE SY	Pédiatrie
Mme Hassanatou	TOURE SOW	Biophysique

ASSISTANTS DE FACULTE - ASSISTANTS
DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

☆ ★ ☆

M. Jean Marie	DANGOU	Anatomie Pathologique
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Sèga	DIALLO	Histologie-Embryologie
M. Yémou	DIENG	Parasitologie
M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie

M. Mamadou	DIOP	Anatomie
M. Moctar	DIOP	Histologie-Embryologie
Mme Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Oumar	FAYE	Parasitologie
M. Oumar	FAYE	Histologie-Embryologie
Mme Gisèle	WOTO GAYE	Anatomie Pathologique
M. Lamine	GUEYE	Physiologie
M. Ismaïla	MBAYE	Médecine Légale
M. Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie
Mme Khadissatou SECK	FALL	Hématologie
M. Ahmad Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
Mme Anta	TAL DIA	Médecine Préventive
M. Kamadore	TOURE	Médecine Préventive

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

☆☆☆

M. EL Hadj Amadou	BA	Ophthalmologie
Mme Mariame BA	GUEYE	Gynécologie-Obstétrique
M. Momar Codé	BA	Neuro-Chirurgie
M. Moussa	BA	Psychiatrie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neuro-Chirurgie
M. Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M. Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme Mariama Saffetou KA	CISSE	Médecine Interne II
Mme. Elisabeth FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
M. Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M. Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
M. Saïdou	DIALLO	Médecine Interne I
M. Papa Ndiouga	DIENG	Anesthésiologie-Réanimation
M. Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M. Rudolph	DIOP	Stomatologie
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie-obstétrique
M. Boucar	DIOUF	Médecine Interne I
M. Ibrahima Fodé	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Médecine Interne I
M. Saliou	DIOUF	Pédiatrie
M. Limamoulaye	HANE	Cardiologie
M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne I
M. Abdoul	KANE	Cardiologie
M. Assane	KANE	Dermatologie
M. Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie

M. David River	KERE	Cancérologie
Mme. Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M. Mouhamadou	MBENGUE	Médecine Interne I
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie
Mme Coura SEYE	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Issa	NDIAYE	O.R.L.
M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
Mme Nafissatou BATHILY	NDOYE	Ophthalmologie
M. Thierno Souleymane	NIANE	Pneumophthisiologie
M. El Hadj	NIANG	Radiologie
M. Abdoulaye	POUYE	Médecine Interne I
M. Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
Melle Anne Aurore	SANKALE	Chirurgie Générale
Melle Anna	SARR	Médecine Interne II
M. Doudou	SARR	Psychiatrie
M. Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M. Birama	SECK	Psychiatrie
M. El. Hassane	SIDIBE	Médecine Interne II
M. Charles Mouhamed	SOW	Orthopédie-Traumatologie
M. Daouda	SOW	Psychiatrie
M. Papa Salif	SOW	Maladies Infectieuses
M. Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Chelckna	SYLLA	Urologie
M. Alé	THIAM	Neurologie
M. Gilbert	TENDING	ORL

ATTACHÉS - ASSISTANTS DES SCIENCES FONDAMENTALES

☆ ★ ☆

M. Allou	KEBE	Physiologie
M. El Hadji Alloune	LO	Anatomie
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Issa	WONE	Médecine Préventive

SECTION CHIRURGIE DENTAIRE

MAITRES -ASSISTANTS

☆ ☆ ☆

M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
Melle Fatou	GAYE	Dentisterie Opératoire
M. Abdoul Wakhabe	KANE	Dentiste Opératoire
Mme Charlotte Faty	NDIAYE	Pathologie et Thérapeutique Spéciales
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie
M. Abdoul Aziz	YAM	Pathologie et Thérapeutique Dentaires

ASSISTANTS DE FACULTÉ

☆ ☆ ☆

Mme Christiane AGBOTON	JOHNSON	Prothèse Dentaire
Mme Aïssatou	BA TAMBA	Pédodontie Préventive
Mme Khady DIOP	BA	Orthopédie-Dento Faciale
Mme Maïmouna BA	BADIANE	Dentisterie Opératoire Fondamentales
M. Daouda	CISSE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme Adam Marie Awa SECK	DIALLO	Parodontologie
M. Boubacar	DIALLO	Odontologie Chirurgicale
Mme Affissatou NDOYE	DIOP	Dentisterie Opératoire
M. Libasse	DIOP	Prothèse Dentaire
Mme Fatou	DIOP	Pédodontie - Prévention
M. Mamadou Moustapha	GUEYE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Malick	MBAYE	Dentisterie Opératoire
Mme Paulette Mathilde	AGBOTON MIGAN	Matières Fondamentales
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
Mme Maye Ndave NDOYE	NGOM	Parodontologie
M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
Mme Soukèye DIA	TINE	Odonlo-Stomatologie
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire
M. Younes	YOUNES	Prothèse Dentaire

ATTACHES

☆ ☆ ☆

Mme Marie Suzane	TINDING BADJI	Odontologie Chirurgicale
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Paul Dèbé	NIANG	Odontologie Chirurgicale

CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

☆☆☆

M. Michel	POTDEVIN	Physique Pharmaceutique
M. Bernard	WILLER	Chimie analytique

MAÎTRES-ASSISTANTS

☆☆☆

M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
Mme Aïssatou	GAYE DIALLO	Bactério-Virologie
M. Papa Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique
M. Alloune	DIEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie
Rita BEREHOUNDOUGOU	NONGONIERMA	Pharmacognosie

ASSISTANTS

☆☆☆

Mlle Issa Bella	BA	Parasitologie
M. Aynina	CISSE	Physique Pharmaceutique
Mme Aminata SALL	DIALLO	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
Mlle Thérèse	DIENG	Parasitologie
M. Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
Mme Aminata GUËYE	SANOKHO	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Modou	LO	Botanique
M. Philomène	LOPEZ	Biochimie Pharmaceutique
M. Tharcisse NKULINKIYE	MFURA	Chimie Analytique
Mme Maguette Dème	SYLLA-NIANG	Biochimie Pharmaceutique
M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
Mme Aïssatou GUEYE	SANKHARE	Toxicologie
M. Elimane Amadou	SY	Chimie Générale et Minérale
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique
M. Alassane	WELE	Chimie physique

ATTACHÉS

☆ ★ ☆

M. Idrissa	BARRY	Pharmacognosie
Melle Ourèye	DABO	Pharmacognosie
M. Amadou Maclar	DIÈYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M. Alloune Badara	DIOP	Pharmacie Galénique
M. Djibril	FALL	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Aly Coto	NDIAYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Bara	NDIAYE	Chimie analytique
Mme Maïmouna NIANG	NDIAYE	Physiologie Pharmaceutique (Pharmacologie et Pharmacodynamie)
M. Boubacar	NIANE	Chimie Analytique
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Mamadou	TOURE	Biochimie Pharmaceutique

JE

DEDIE

CE

TRAVAIL



**A ALLAH, LE TOUT PUISSANT,
LE MISERICORDIEUX ET A SON
PROPHETE MOHAMED
(PSL)**

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS

Que Dieu vous ouvre les portes de son paradis.

A MON PERE

Plus qu'un père, tu as été pour moi un grand ami. Tu as consenti maints sacrifices pour la réussite de tes enfants;

la qualité de l'éducation que tu as su nous donner fait de toi, un père aimé et admiré par ses enfants et ses proches.

J'ai vu en toi un père exemplaire; ta simplicité, ton humilité, ta modestie et ton honnêteté m'ont beaucoup marquée.

Qu'ALLAH Le Tout Puissant te donne santé et longévité et éclaire ma lanterne afin que je puisse t'honorer.

A MA MERE

Pour toi j'ai envie d'écrire un poème.

Adorable maman, je ne sais par où commencer car les mots ~~est~~ imparfaits pour toi. Jamais tu n'as failli à ton devoir de mère; car tu m'as toujours guidée dans la vie, prodiguée des conseils judicieux et soutenue au cours de mes études.

Que l'avenir soit pour toi soulagement et satisfaction.

Qu'Allah te protège, t'accorde santé et longévité afin que tu jouisses du fruit de ton labeur.

Ce travail est le votre. En cette circonstance, que le fruit de l'effort soutenu pendant toutes mes années d'étude puisse vous exprimer ma grande admiration et ma profonde gratitude.

AU DOCTEUR ABDOULAYE SY

Pour ces années passées ensemble, pour la compréhension, la disponibilité, le soutien constant et l'amour que tu as toujours su manifester à mon égard.
Ce travail est le tien. Sois assuré de ma profonde affection et mon amour éternel

A MES FRERES ET SOEURS

Issaga, Amara, Abasse, Makhtar, Omar, Maïmouna, Marième SY.
J'ai toujours apprécié l'estime que vous portez en mon égard.
Sachez qu'elle est réciproque.
Pussions - nous rester aussi unis dans la tendresse, solidaires dans la vie et fidèles à l'éducation que nos chers parents ont su nous inculquer.

A KINE ET NDEYE CODOU

En témoignage de mon profond attachement.

A TONTON CHEIKH SAAD-BOUH SYLLA "GAINE"

profond respect.

A TONTON MAMADOU SARR

Merci infiniment.

A MES ONCLES ET TANTES

Sincère affection. Puisse nos liens de famille se resserrer davantage.

A MES BADIENES,

Toute ma gratitude.

A MES COUSINS ET COUSINES

Merci pour votre soutien

A MES NEVEUX ET NIECES

Que la porte du bonheur, de la réussite vous soit ouverte.

A TIDIANE ET NDIEME

Que Dieu vous unisse pour toujours

A BINETA SOW

Tu m'as toujours encouragée et soutenue au cours de mes études, conseillée dans les moments les plus difficiles .
Profonde affection et reconnaissance infinie.

A IPHI NDIAYE, ROKHAYA DIAGNE, SALIMATA SECK, SOUKEYNA SY ET RACKY DIALLO

En témoignage de tant d'années passées ensemble. Courage et persévérance.

A MES CAMARADES DE PROMOTION

Sans exception

A MES AMI(E)S

Qui sauront sans se voir nommer, trouver ici toute ma sympathie. J'espère que le temps et les années ne nous sépareront pas car "l'amitié est un joyau si rare que seul le coeur peut lui servir d'écrit".

Que chacun trouve ici, l'expression de mon attachement.

A Mme BOCOUM

En témoignage de ma profonde affection.

**AUX FAMILLES, SY, DIAW, SYLLA, NDIAYE, SOW, LY, WONE,
TRAORE, DIOP, DIAGNE, DIENG, NIANG, SENHOR, NDAO,
WADE, THIAM, DIOUF.**

REMERCIEMENTS

A tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'élaboration et à la rédaction de ce travail.

Au personnel du Laboratoire de Bactériologie-Virologie, en particulier:

Cheikh SY, Omar KAIRE, Babacar GNING, Edgard MAKONDO,
Amadou OUANGRE, Fatou SECK, Ndeye Coumba TOURE, Omar SAGNA,
Djiby SAMBOU, Ngoné SAMB, Leyfou DABO,

Merci infiniment.

A L'équipe d'Immunologie cellulaire de l'Institut Pasteur de
Dakar.

Merci pour votre aide.

A

NOS

MAITRES

ET JUGES



A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE JURY

Monsieur Le Professeur Doudou BA

Vous nous faites le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse malgré vos multiples charges.
Merci infiniment.

Nous avons toujours apprécié votre méthode et votre rigueur pour le travail bien fait. Qu'il nous soit permis de vous témoigner toute notre admiration. Veuillez croire à l'expression de nos sentiments respectueux.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Abibou SAMB

Vous avez spontanément accepté de faire partie de notre jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et nos sentiments respectueux.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Mamadou BADIANE

Vous nous avez fait l'honneur de siéger à notre jury de thèse. Votre esprit ouvert et avisé, vos qualités humaines forcent notre admiration. Nous vous en remercions très sincèrement.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Monsieur Le professeur Souleymane MBOUP

Votre disponibilité et votre rigueur dans le travail nous ont séduit. Nous avons surtout apprécié la richesse de votre expérience dans le domaine de la bactériologie et de la virologie. Soyez en remercié.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Le Docteur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Vous avez bien voulu nous accepter dans votre laboratoire et vous vous êtes évertué à nous assurer malgré vos nombreuses occupations, un encadrement sans faille, aussi satisfaisant que possible.

Nous avons le plaisir de vous présenter ici nos sincères remerciements pour la disponibilité dont vous avez fait preuve. Nous avons beaucoup apprécié votre compétence, votre rigueur, votre courtoisie et votre sens de l'humour. Soyez assuré de notre reconnaissance.

"Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation"

A B R E V I A T I O N S

ACA	:	Acide 7 aminocéphalosporine
APA	:	Acide 6 aminopénicillanique
CMI	:	Concentration minimale inhibitrice
ATB	:	Antibiotique
LCR	:	Liquide Cephalorachidien
P	:	Pus
U	:	Urines
PO	:	Pus d'otite
PV	:	Prélèvement vaginal
Sg	:	Sang
Péni G:		Pénicilline G
NS	:	Not spécifié
HALD	:	Hôpital Aristide le DANTEC
HPD	:	Hôpital principal de Dakar
HEAR	:	Hôpital d'enfant Albert Royer
CHU	:	Centre hospitalier Universitaire
C	:	Coproculture
MH	:	Mueller Hinton
ED	:	Eau distillée
TBE	:	Tris Borate-EDTA
BET	:	Bromure d'éthidium
SDS	:	Sulfate Docédy-Sodium
IPD	:	Institut Pasteur Dakar
IHS	:	Institut d'hygiène Social
EDTA	:	Ethylene diamine Tétracétique
PG	:	Péni G
OX	:	Oxacilline
AM	:	Ampicilline
AMC	:	Amoxicilline + Acide clavulanique
AMX	:	Amoxicilline
CAZ	:	Ceftazidime
CRO	:	Ceftriaxone
CTX	:	Céfotaxime
CZ	:	Céfazoline
NT	:	Nombre total
% T	:	Pourcentage total
B-lmase:		Béta-lactamase
PVT	:	Prélèvement
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
ADN	:	Acide desoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
Cscl	:	Chlorure de césium
CSP	:	Céphalosporines
LAB	:	Labia
Phil	:	Phillipon
Rich	:	Richmond
Syk	:	Sykes
case	:	Céphalosporinase
BGN	:	Bacille Gram Négatif
MRSA	:	Staphylococcus aureus Méti-R
MSSA	:	Staphylococcus aureus Méti-S

P L A N

INTRODUCTION

I^{ère} PARTIE: GENERALITES

CHAPITRE I: LES PLASMIDES

I.1 - Définition et caractères portés par les plasmides.....	4
I.2 - Plasmides de résistance aux antibiotiques.....	5
I.3 - Propriétés générales des plasmides.....	8
I.3.1 - Plasmides conjugatifs.....	8
I.3.2 - Plasmides non conjugatifs.....	9
I.4 - Classification des plasmides: Incompatibilité.....	10
I.4.1 - Définition.....	10
I.4.2 - Technique.....	10
I.4.3 - Groupe d'incompatibilité.....	11
I.5 - Les gènes de résistance transposables.....	12
I.6 - Principe de détection et de caractérisation des plasmides de résistance aux antibiotiques.....	17

CHAPITRE II: RESISTANCE BACTERIENNE

II.1 - Notion de résistance.....	22
II.2 - Différents types de résistance:.....	23
II.2.1 - Résistance naturelle.....	23
II.2.2 - Résistance acquise.....	23
II.3 - Mécanisme de résistance:.....	24
II.3.1 - Génétique:.....	24
. Résistance chromosomique.....	24
. Résistance plasmidique.....	24
II.3.2 - Chimique:.....	27
. Par imperméabilité.....	27
. Par modification de PLP.....	31
. Enzymatique.....	32

CHAPITRE III : LES BETA-LACTAMASES

III.1 - Rappel sur les Béta-Lactamines.....	35
III.2 - Les bêta-lactamases.....	46
III.3 - Structure - Origine - Localisation.....	49
III.4 - Mécanisme d'action.....	50
III.5 - Classification des Béta-Lactamases.....	50

II^{ème} PARTIE: TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE I : CADRE DE L'ETUDE

I.1 - L'Hôpital Aristide Le DANTEC.....	54
I.2 - Le Laboratoire de Bactériologie.....	55

CHAPITRE II: METHODOLOGIE

II.1 - Les souches bactériennes:.....	56
II.1.1 - Répartition globale des souches bactériennes.....	57
II.1.2 - Répartition suivant la nature du prélèvement.....	58
II.1.3 - Origine des souches bactériennes.....	59
II.2 - Matériel et réactifs:.....	59
II.2.1 - Pour la détection des bêta-lactamases.....	60
II.2.2 - Pour la recherche des plasmides	60
. Extraction.....	60
. Electrophorèse en gel d'agarose.....	61
. Révélation - Détection.....	61
II.3 - Méthodes:.....	63
II.3.1 - Détection des bêta-lactamases:	
Méthode par la "CEFINASE".....	63
. Principe.....	63
. Technique.....	63
. Lecture.....	63
II.3.2 - Recherche des plasmides:.....	63
. Souches testées.....	63
. Extraction.....	64
II.3.3 - Electrophorèse.....	66
. Principe.....	66
. Technique.....	66
. Lecture et exploitation.....	67

CHAPITRE III: RESULTATS GLOBAUX ET COMMENTAIRES

III.1 - Les bêta-lactamases: Profil de	
résistance de l'ensemble des souches testées.....	68
III.1.1. Activité des céphalosporines.....	68
III.1.2. Activité des pénicillines.....	69
III.2 - Profil de résistance des différentes	
espèces bactériennes aux antibiotiques.....	70
III.2.1. Sur les cocci.....	70

III.2.2. Sur les bacilles Gram négatifs.....	71
III.2.2.1. Entérobactéries.....	71
III.2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
III.3 - Fréquence de détection de la sécrétion de bêta-lactamases chez les entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
III.4 - La multirésistance.....	75
III.5 - Sécrétion de bêta-lactamases.....	79
III.6 - Résultats globaux de l'électrophorèse sur gel d'agarose du DNA plasmidique.....	80
III.7 - Profils plasmidiques.....	87

CHAPITRE IV: DISCUSSION

IV.1 - Fréquence de détection des plasmides.....	93
IV.2 - Corrélation Plasmides de résistance et sécrétion de bêta-lactamases.....	99
IV.3 - Corrélation Plasmides - Bêta-lactamases et Phénotypes de résistance.....	103

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Fleming, en 1929, observe la disparition des colonies de Staphylococcus aureus autour de colonies de Penicillium notatum contaminant une culture en boîte de pétri.

Plus de cinquante ans ont passé, et presque une cinquantaine de béta-lactamines sont utilisées en thérapeutique. Cependant, la benzyl-pénicilline de Fleming reste l'antibiotique de première intention dans des maladies aussi graves que la pneumonie à Pneumocoque ou la syphilis.

Pourtant, avant même que la pénicilline soit utilisée en thérapeutique, Abraham et Chain observent en 1940, que des extraits de différentes bactéries détruisent la pénicilline.

L'agent responsable de l'activité en cause fut dénommé quatre ans plus tard: Pénicillinase.

En 1948, Hutter et Welsch décrivent une activité antipénicillinase, produite par Penicillium notatum et d'autres Penicillium, et dénomment la substance en cause: Notalysine.

Ainsi, l'étude de la résistance est donc actuellement une partie importante et nouvelle des études sur les bactéries.

Cette étude de la résistance doit permettre de répondre à des questions d'ordre médical, pharmacologique.

Les questions les plus immédiates sont posées par le praticien qui doit connaître les chances de succès en prescrivant un antibiotique. Certes, l'isolement de la bactérie en cause et l'étude de la sensibilité par l'antibiogramme peuvent répondre à cette question mais dans la pratique médicale, et en particulier dans les pays en voie de développement, l'appel efficace au laboratoire ne se fait que dans des cas exceptionnels et privilégiés.

De ce fait en 1950, a commencé l'étude d'antibiotiques semi-synthétiques de 2ème génération. Ces antibiotiques sont le résultat de recherche des modifications de la formule chimique initiale susceptible d'apporter des améliorations dans leur activité.

Les améliorations recherchées sont d'ordre pharmacologique (voie d'introduction, concentrations humorales, stabilité, tolérance), soit d'ordre bactériologique. Dans ce dernier cas le dérivé semi-synthétique doit être actif sur des groupes de bactéries insensibles au produit initial. Dans le cas des bêta-lactamines semi-synthétiques (Pénicillines et Céphalosporines) on a cherché à obtenir des produits de moins en moins inactivés par les bêta-lactamases des bactéries résistantes.

Cette recherche s'est avérée positive à 50 % car de nos jours, nous sommes confrontés à un problème de multirésistance bactérienne des souches des infections hospitalières. Il arrive même que ces souches présentent une résistance aux céphalosporines de 3ème génération.

Cette résistance est d'origine diverse. Elle peut être due soit:

- à une modification de la molécule qui constitue la cible de l'antibiotique,
- à la production d'enzymes capables d'inactiver la molécule de l'antibiotique.

Ces enzymes diffèrent, selon la nature de la bactérie productrice.

Les bactéries à Gram positif ne synthétisent de bêta-lactamases que dans la mesure où l'antibiotique, la bêta-lactamine, est présent: l'enzyme inductible est produite en grande quantité et est libérée dans le milieu extérieur.

Les bactéries à Gram négatif produisent des bêta-lactamases en général constitutives, en quantité réduite, l'enzyme n'étant pas libéré dans le milieu extérieur mais restant dans l'espace périplasmidique.

- à la modification de la pénétration de l'antibiotique.

La résistance peut également être gouvernée par des gènes localisés sur le chromosome bactérien, ou sur une molécule d'ADN extrachromosomique (plasmide). Ainsi, l'étude de ces plasmides constitue l'objectif essentiel de notre travail.

Pour ce travail nous adoptons le plan suivant:

- les généralités qui engloberont la définition, la classification, les propriétés générales et le principe de détection des plasmides.

- Dans le travail personnel nous parlerons surtout des méthodes de détection des bêta-lactamases et la recherche des DNA plasmidiques par électrophorèse sur gel d'agarose.

- Les résultats porteront sur les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines et les profils plasmidiques des souches.

I ère PARTIE

GENERALITE

Chapitre I: Les plasmides

I.1 – Définition et caractères portés par les plasmides (20)

Les plasmides sont des molécules de DNA double brin circulaire, extrachromosomique, douées de réplication autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations.

En général les plasmides des procaryotes ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie hôte.

Les plasmides bactériens sont le support d'une très grande variété de caractères (ou déterminants),

Tableau I: Propriétés codées par les plasmides bactériens.

- Réplication autonome.
- Incompatibilité des plasmides apparentés.
- Fertilité (autotransfert) chez les plasmides conjugatifs.
- Exclusion de surface.
- Inhibition d'entrée.
- Mobilisation.
- Modification, restriction du DNA.
- Recombinaison, transposition de gènes.
- Résistance et sensibilité aux antibiotiques, phages, métaux lourds, détergents, radiations, agents radiomimétiques, sérum.
- Facteurs d'adhérence et de pathogénicité (endotoxine).
- Capacité d'induire des tumeurs chez les plantes.

qui confèrent à la bactérie hôte une grande souplesse génétique.

C'est ainsi qu'ils permettent soit une meilleure adaptation à un environnement défavorable ou fluctuant, soit une implantation dans certains hôtes, soit une compétition victorieuse (par croissance privilégiée) avec d'autres micro-organismes de même espèce ou d'espèce différente.

Les plasmides les plus étudiés et les plus importants en pathologie infectieuse, humaine et vétérinaire sont ceux qui confèrent la résistance aux antibiotiques (plasmides R ou facteurs R)

Un plasmide peut, et c'est d'ailleurs généralement le cas coder pour la résistance aux antibiotiques et pour un ou plusieurs autres types de caractères.

I.2 – Plasmides de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques par mutation chromosomique résulte d'un changement des structures cellulaires existantes, qui rend la cellule imperméable à un ou plusieurs antibiotiques ou encore rend les cibles intracellulaires spécifiques pour ces antibiotiques indifférentes à la présence de ou des antibiotiques. (Tableau II)

Tableau II: Antibiotiques auxquels une bactérie peut résister par altération de leur site d'action à la suite d'une mutation chromosomique.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Béta lactamines - Aminosides: Streptomycine,
Néomycine, kanamycine,
Tobramycine, Gentamycine. - Chloramphénicol - Erythromycine - Rifampicine - Phosphomycine - Acide fusidique - Quinolones |
|---|

La résistance liée à la présence de plasmides R est généralement due à une synthèse de protéines. Elle concerne la quasi totalité des antibiotiques.

Les exceptions sont rares. (Tableau III)

Tableau III : Antibiotiques auxquels aucune résistance plasmidique n'a été détectée.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Rifampicine - Polypeptides: <u>Bacitracine, Polymyxine B, Colistine.</u> - Furanes - Quinolones: <u>Acide nalidixique, Acide oxolinique, Acide pipémidique.</u> - Vancomycine |
|---|

La résistance plasmidique peut être due à plusieurs éléments:

- > à l'altération de la cible de l'antibiotique
- > à la diminution du transport de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule
- > à la détoxification enzymatique de l'antibiotique et à la substitution de la cible de l'antibiotique.

Les deux premiers mécanismes peuvent également être secondaires à des mutations chromosomiques.

La résistance aux antibiotiques induite par des gènes plasmidiques peut également suivre au moins 3 voies autres que les mécanismes précédents.

- la plus simple est la destruction immédiate de l'antibiotique.

C'est le cas dans la résistance aux antibiotiques tels que la pénicilline, le chloramphénicol, les antibiotiques aminoglycosidiques comme la streptomycine.

- dans la seconde voie, l'accès de la substance toxique à sa cible cellulaire est bloqué.

- La troisième voie consiste à substituer un processus de dérivation au processus qui inhibe l'agent antibactérien : c'est par ce mécanisme que les bactéries résistent aux sulfamides et au triméthoprim; antibiotiques qui inhibent des enzymes bactériennes nécessaires à la synthèse d'une vitamine essentielle, l'acide folique (les êtres humains, à la différence des bactéries, sont incapables de synthétiser cette vitamine ; ils dépendent des sources alimentaires qui fournissent trop peu d'acide folique pour entretenir les bactéries infectantes). La résistance à ces antibiotiques nécessite le remplacement de l'enzyme inhibée par une autre enzyme douée de la même fonction mais insensible à l'antibiotique.

Les plasmides R peuvent ainsi conférer la résistance à un ou plusieurs antibiotiques de famille différente. Lorsque des plasmides différents coexistent chez la même bactérie, la conjonction de ces deux phénomènes ajoutée à la résistance intrinsèque (de base ou naturelle) de l'hôte la rend résistante à tous les antibiotiques. Les infections dues à de telles bactéries constituent de véritables impasses thérapeutiques.

Depuis leur découverte au Japon en 1959, il est bien établi que les plasmides R sont responsables de la grande majorité des résistances observées chez les bactéries pathogènes isolées en clinique.

La résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent, mais l'existence de bactéries polyrésistantes, l'apparition de nouveaux caractères de résistance et l'émergence de la résistance chez des espèces considérées jusqu'alors comme "universellement sensibles" à certains produits (par exemple : Haemophilus aux Bêta-lactamines, Tétracyclines, Chloramphénicol, aminosides; les Gonocoques aux Bêta-lactamines) en font un problème de santé grave et rapidement évolutif. L'étude biologique et épidémiologique des plasmides et celle des mécanismes biochimiques de la résistance sont un préalable à la prévention ou au ralentissement du développement de cette résistance.

Il faudrait aussi préciser que les plasmides n'ont pas que des inconvénients par leur incidence sur les moyens thérapeutiques. Un outil précieux de la biologie moléculaire, en tant que vecteurs de clonage au cours des manipulations génétiques.

I-3 Propriétés générales des plasmides

Les plasmides ont une masse moléculaire de 0,5 à 400 Mégadaltons (MD*), chiffre petit relativement au chromosome (2000 MD en moyenne).

* 1 micromètre ($\mu\text{m} : 10^{-6} \text{ m}$) = 2 Mégadaltons (MD : 10^6 daltons) = 3 kilobases (Kb : 1000 paires de bases).

Dans toutes les espèces bactériennes, ils peuvent être isolés sous forme de DNA bicatenaire circulaire superhélicoïdal. Leur principale caractéristique est la réplication autonome. Celle d'un plasmide ne doit pas être plus rapide que celle du chromosome de la bactérie hôte (par opposition aux virus) et ne doit pas être plus lente sous peine de dilution au cours de la croissance de la population. Les plasmides peuvent être divisés en deux types: les plasmides conjugatifs et les plasmides non conjugatifs.

I.3.1 – Plasmides conjugatifs

Un plasmide conjugatif est autotransmissible d'une cellule à une autre, c'est-à-dire qu'il code les fonctions nécessaires à son transfert. Les plasmides conjugatifs ont une masse moléculaire supérieure à 30 Md. Un plasmide "typique" de Escherichia coli mesure approximativement 60 Md et, chez les plasmides les plus étudiés, l'ensemble des fonctions connues correspond = à 25 Md ; les gènes de transfert représentent un tiers de la molécule. La réplication de ces plasmides est soumise à un contrôle strict, c'est-à-dire que le nombre de copies plasmidiques par copie de chromosome est faible (1 à 3) .

La présence de tels plasmides dans une cellule s'accompagne de la synthèse d'appendices protéiques appelés pili sexuels et de nombreuses protéines nécessaires au processus complexe de la conjugaison chez les plasmides naturels, le transfert est généralement réprimé.

La conjugaison a été décomposée en séquence d'étapes suivantes :

- > un cycle de contacts spécifiques au cours duquel s'effectuent les interactions pili-paroi, puis paroi-paroi, conduisant à la formation d'agrégats cellulaires ;
- > le déclenchement de la "mobilisation" qui consiste en une étape de synthèse du DNA conjugatif ;
- > Le transfert unidirectionnel d'un seul brin de DNA .

-> la réplication, c'est-à-dire la synthèse d'un brin complémentaire dans la cellule réceptrice, suivie de la recircularisation.

Ces diverses étapes sont, pour la plupart, sous le contrôle direct de produits codés par le plasmide, mais font également intervenir des protéines codées par la cellule hôte.

Le DNA de ces plasmides est généralement organisé en groupes fonctionnels. Les régions correspondantes à ces fonctions (réplication et son contrôle, transfert, résistance aux antibiotiques etc... fonctions inconnues) sont localisées dans des parties distinctes du génome plasmidique.

1.3.2 – Plasmides non conjugatifs

Ces plasmides ont des masses moléculaires comprises entre 0,5 et 50 Md. Un plasmide non conjugatif "moyen" a une masse moléculaire d'environ 5 Md et code rarement pour la résistance à plus de deux familles d'antibiotiques. De nombreux plasmides de ce type sont cryptiques ; ils ne codent pour aucune fonction décelable hormis l'auto-réplication, et ne sont détectés que par les techniques physiques.

Leur réplication est soumise à un contrôle relâché, c'est-à-dire que le nombre de copies plasmidiques par copie chromosomique est élevé (supérieur à 10).

Ces plasmides ne codent pas pour les fonctions permettant d'induire le déclenchement du cycle des contacts spécifiques, au cours de la conjugaison, mais codent généralement pour les enzymes et comportent les sites nécessaires à l'étape de mobilisation. Ces plasmides ne peuvent donc être transférés que par "mobilisation" par un autre plasmide présent dans la même bactérie.

La dissémination des plasmides peut ainsi se faire soit par conjugaison, soit par mobilisation. De plus, conjuguatifs ou non, les plasmides peuvent être disséminés par transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage) ou par transformation (incorporation directe de DNA).

I-4 Classification des plasmides : INCOMPATIBILITE

Les plasmides peuvent être classés selon différents critères. Un des plus utilisés est l'incompatibilité.

I.4.1 – Définition

Deux plasmides sont dits incompatibles s'ils sont incapables de coexister de façon stable dans la même cellule.

Lorsque deux plasmides naturels sont incompatibles, ils peuvent descendre d'un ancêtre commun, mais l'incompatibilité ne suffit pas à prouver une telle relation.

L'incompatibilité est un phénomène observé généralement dans tous les genres bactériens étudiés (par exemple: Entérobactéries, Pseudomonas, Staphylocoques et Streptocoques). Il est possible d'établir une classification des plasmides dans chaque genre bactérien en étudiant la capacité de coexistence de 2 plasmides dans un hôte adéquat. Les plasmides incompatibles sont assignés au même groupe, et les plasmides compatibles à des groupes différents.

I.4.2 – Technique

Pour étudier une paire de plasmides (pA et pB), on introduit le plasmide pB (par conjugaison, transformation ou transduction) dans la bactérie qui héberge déjà le plasmide pA. On sélectionne pour un caractère du plasmide pB (plasmide entrant) et on examine le devenir du plasmide pA (plasmide résident) dans les transciipients (bactéries ayant acquis le plasmide pB).

Si le plasmide pA est éliminé (parfois, c'est le plasmide pB qui est rejeté), pA et pB sont dits incompatibles.

Ce résultat est confirmé en pratiquant l'expérience en sens inverse, par introduction du plasmide pA dans une cellule hébergeant déjà pB.

Au contraire, si le plasmide résident est retenu, ainsi que le plasmide entrant, les deux plasmides sont dits compatibles.

I.4.3 – Groupes d'incompatibilité (Inc)

Une vingtaine de groupes d'incompatibilité ont été décrits pour les plasmides autotransférables. Mais nous allons en citer que quelques uns:

- Groupe Inc et type de pilus.

Bien que peu de plasmides aient été examinés pour la détermination du type de pili, il a été montré que d'une part tous les plasmides d'un même groupe d'incompatibilité codent pour des pilis d'un même et seul type et que d'autre part des plasmides de groupes différents codent pour des pilis de type différent.

- Groupes Inc et caractères de résistance.

Il n'existe pas de relation entre le groupe d'incompatibilité et les caractères codés par les plasmides, car les gènes de nombreux caractères phénotypiques bactériens, y compris les gènes de résistance aux antibiotiques sont portés par des séquences de DNA transposables

- Groupes Inc et homologie des DNA

Les acides nucléiques des plasmides d'un même groupe d'incompatibilité ont un haut degré d'homologie. Les plasmides de groupes différents présentent peu d'homologie. La classification fondée sur l'incompatibilité reflète donc bien une parenté structurale étroite entre les plasmides d'un même groupe. Le nombre limité des groupes d'incompatibilité montre que le nombre "d'espèces plasmidiques" est restreint.

- Groupe Inc et taille

Les plasmides d'un groupe sont du même ordre de grandeur.

- Groupe Inc et spécificité d'hôte

Les plasmides de certains groupes d'incompatibilité ont une faible spécificité d'hôte et peuvent se répliquer dans des bactéries appartenant à des genres très nombreux et phylogéniquement très éloignés.

Cette propriété est utilisée pour transférer des gènes dans des espèces différentes.

Inversement, certains genres ou espèces bactériens ne sont capables de repliquer de façon stable que les plasmides appartenant à tel ou tel groupe d'incompatibilité.

I.5 – Les gènes de résistance transposables

Les plasmides transférables de résistance aux antibiotiques sont structuralement et fonctionnellement constitués d'un facteur de transfert et des déterminants de la résistance : le facteur de transfert fournit l'information :

- pour la replication et son contrôle
- pour le maintien
- pour la mobilisation et
- pour le transfert

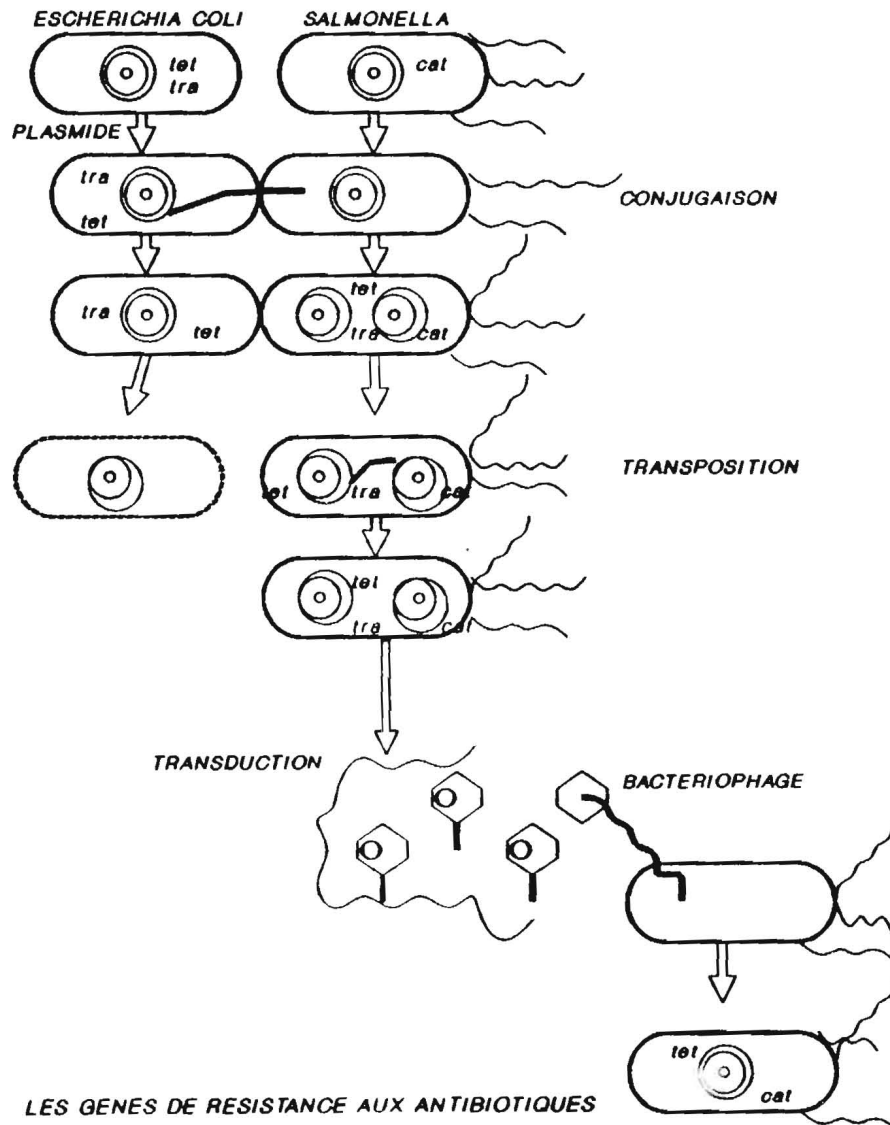
c'est une structure relativement stable ; les gènes de résistance, au contraire, sont souvent portés par des séquences de DNA de petite taille, capables de passer d'un replicon à un autre, désignés transposons.

I.5.1 – Découverte des transposons

L'existence dans le génome des bactéries de segments d'ADN "transposables" d'une bactérie à une autre a été découverte lors des études des mécanismes de transfert de la résistance aux antibiotiques. (schéma n° 1 : Gènes de la résistance aux antibiotiques mécanisme de transfert).

Une bactérie peut posséder (résistance naturelle) ou acquérir (résistance acquise) la capacité de synthétiser une enzyme capable de dégrader tel ou tel antibiotique, par exemple une Bêta-lactamase (capable d'hydrolyser les antibiotiques du groupe des Bêta-lactamines telles que pénicillines, ampicillines.....). La bactérie devient résistante lorsqu'elle est contaminée par un plasmide, possédant le gène codant pour l'enzyme, donc pour la résistance (R).

**Schéma 1 : GENES DE LA RESISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES : MECANISME DE
TRANSFERT**



STANLEY N. COHEN à l'Université STANFORD (USA) montra que certains gènes, notamment des gènes R, celui par exemple de la résistance à l'ampicilline, qui possède 4000 bp, peuvent être "transposés" d'un plasmide à un autre. La particularité de ces gènes transposables, ou transposons, est qu'ils possèdent à leurs deux extrémités deux séquences de bases identiques mais en ordre inverse (figure: 1).

Lorsque les deux brins d'ADN du plasmide sont séparés, les deux segments homologues s'apparient en hélice formant une "tige" entre deux boucles. Ces séquences terminales complémentaires permettraient aux transposons de se mouvoir d'un site à l'autre dans le génome.

I.5.2 – Mécanisme de transfert des gènes de la résistance aux antibiotiques.

Les gènes de la résistance aux antibiotiques sont rassemblés dans les plasmides et transférés d'une cellule bactérienne à une autre selon différents mécanismes, ils permettent parfois au plasmide de survivre à la mort de son hôte.

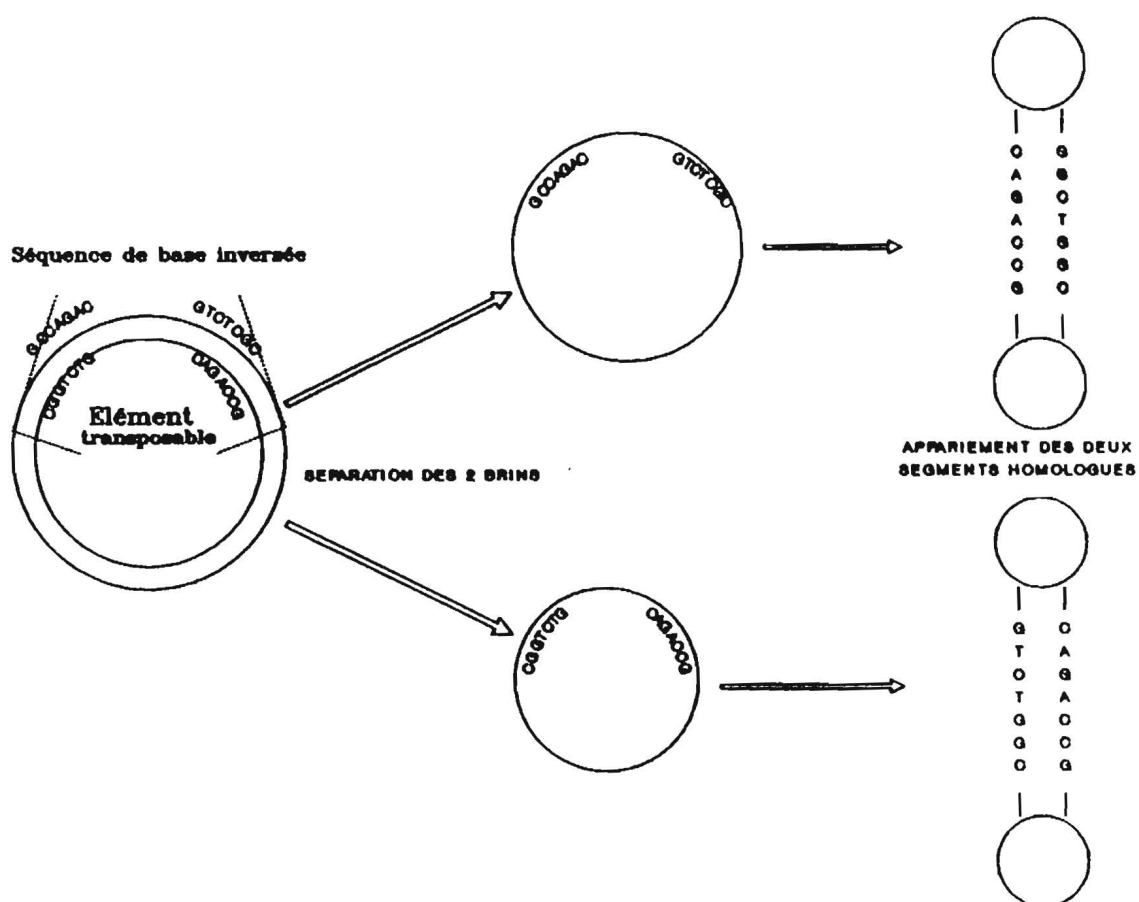
ex : Deux bactéries sont représentées :

- une cellule de Escherichia coli renfermant un plasmide porteur des gènes de transmission par conjugaison (tra) et de résistance à la tétracycline (tet)
- une cellule de Salmonella contenant un plasmide porteur d'un gène de résistance au Chloramphénicol (cat). Les deux cellules s'apparient par conjugaison et le plasmide porteur du gène tet est transféré à la Salmonelle, rendant celle-ci résistante à la tétracycline et au chloramphénicol.

Dans un environnement contenant les 2 antibiotiques, les bactéries Escherichia coli meurent mais leurs plasmides survivent chez l'hôte plus favorisé. Le gène (tet) est sur un transposon qui sera transféré par la suite d'un plasmide à l'autre ; ce dernier sera alors porteur des gènes de résistance aux deux antibiotiques.

A ce stade, on peut de nouveau transférer par transduction le plasmide portant la double résistance. Un virus B ou bactériophage, infecte la salmonelle; y prolifère et la tue ; une particule de phage incorpore le plasmide au lieu de l'ADN viral et le transfère à une nouvelle cellule (60).

Figure 1 : FORMATION D'UNE STRUCTURE EN HELICE GRACE A L'EXISTENCE DE SEQUENCE DE BASES COMPLEMENTAIRES ET INVERSEES.



Les déterminants de la résistance sont capables de "sauter" de plasmide à plasmide, de chromosome à plasmide et de plasmide à chromosome. Ce phénomène participe à la dissémination de la résistance aux antibiotiques et l'on peut parler de véritables épidémies de gènes ; il est responsable de la présence de gènes homologues sur des plasmides d'origine très différent, donc de l'absence de relation entre le groupe d'incompatibilité et les caractères de résistance (Bêta-lactamines). Il est maintenant évident que tout gène, y compris les gènes conférant la résistance aux agents antibactériens peut être situé sur un transposon.

La transposition a une fréquence variable, fonction du transposon ; elle s'effectue de façon indépendante des fonctions de recombinaison réciproque de la bactérie hôte. Elle ne nécessite donc pas d'homologie entre les DNA qui interagissent, d'où la présence de caractères de résistance identique sur des plasmides non apparentés.

La transposition, de même que le transfert plasmidique, entraîne une duplication de l'information génétique.

Après la réplication, le donneur et le receveur se retrouvent, chacun en possession d'une copie de l'information.

I.5.3 – Emplacement du transposon

Où s'est donc inséré le transposon ?

Deux possibilités, intéressantes à des titres divers, se présentent :

- Le transposon s'intercale dans la chaîne de l'ADN, au beau milieu d'un gène. L'expression de ce gène est alors supprimée : c'est une mutation. Et sur le chromosome inséré entre les deux parties du gène "cassé", se trouve un nouveau gène, celui qui confère la résistance à l'antibiotique, portée par le transposon.

- Le transposon se place à un endroit où il ne détruit aucun gène : la bactérie a acquis un fragment d'ADN supplémentaire ; comportant un gène de résistance à l'antibiotique, sans subir de mutations qui détruisent ou modifient l'une de ses fonctions.

I.6 – Principe de détection et de caractérisation des plasmides de résistance aux antibiotiques

La démonstration de la nature plasmidique d'un ou de plusieurs caractères de résistance aux antibiotiques chez une bactérie ainsi que l'étude et la caractérisation des plasmides font appel à des techniques génétiques et biologiques. Deux approches sont possibles:

- La première consiste à "curer" (c'est à dire à faire perdre) le ou les plasmides de la souche étudiée et à vérifier la corrélation entre la perte du (ou des) caractère (s) et la disparition du DNA plasmidique.
- La seconde, inverse de la première, consiste à transférer le plasmide dans une souche qui en est dépourvue, et à vérifier la corrélation entre acquisition du(des) caractère(s) et acquisition du DNA plasmidique.

I.6.1 – Technique génétique

I.6.1.1. Cure

Cette technique est particulièrement utile en cas de plasmide non autotransférable (comme les plasmides de Staphylococcus aureus) ou non mobilisable. Les produits qui inhibent sélectivement la replication plasmidique, entraînent la perte simultanée de l'ensemble des résistances portées par le plasmide. De nombreux produits qui interfèrent avec la ségrégation plasmidique normale, ou sélectionnent des ségrégants spontanés, peuvent également être utilisés (Tableau IV)

Tableau IV : Agents ou procédés de cure plasmidique

Agents ou procédés	Produits de cure
Agents intercalants	. Acridine orange . Bromure d'éthidium . Acriflavine, quinacrine
Inhibiteurs de RNA polymérase	. Rifampicine
Inhibiteurs de DNA gyrase	. Novobiocine . Coumercycine
Surfactants	. Dodécyl - sulfate de sodium (SDS)
Changement de 0°C de culture	

I.6.1.2. Transfert

Le transfert d'un plasmide d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice peut se faire par :

- conjugaison
- mobilisation
- transduction
- transformation

Le transfert d'un ensemble de caractères n'implique pas que tous ces caractères soient portés par un seul plasmide ; il peut y avoir en effet cotransfert de plusieurs plasmides. Inversement, l'absence de transfert ne signifie pas l'absence de plasmide.

-> Transfert par conjugaison.

Nous avons vu que de nombreux plasmides sont capables d'organiser leur propre transfert par conjugaison, c'est à dire par contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Les bactéries peuvent être mises en présence en milieu solide ou liquide. Après conjugaison, la suspension bactérienne est étalée sur un milieu qui sélectionne les receveurs ayant acquis le plasmide et contre sélectionne donneurs et receveurs.

Ce milieu contient un antibiotique auquel le plasmide confère la résistance et, par exemple, un antibiotique auquel la souche réceptrice est résistante à la suite d'une mutation chromosomique.

-> Transfert par mobilisation.

En cas de plasmide non autotransférable mais mobilisable, on revient au problème précédent par l'introduction préalable, dans la bactérie donatrice, d'un plasmide autotransférable.

-> Transfert par transduction

Dans ce cas, le transfert du plasmide, qu'il soit conjugatif ou non, s'effectue par l'intermédiaire d'un bactériophage. Le phage incorpore alors dans sa "tête", à la place de son propre DNA, une quantité à peu près équivalente de DNA plasmidique.

L'inconvénient majeur de cette technique est la possibilité de "remaniement" du plasmide, par recombinaison avec le phage ou par délétion.

De plus ce transfert n'est possible qu'entre bactéries phylogéniquement proches sur lesquelles le phage peut se fixer.

-> Transfert par transformation

C'est une technique d'étude des plasmides très utile. Conjugatifs ou non, les plasmides peuvent être introduits dans une bactérie réceptrice préalablement rendue compétente. Toutefois, l'obtention de DNA plasmidique au moins partiellement purifié constitue un préalable à cette approche. Une fois introduit dans l'hôte B approprié, le DNA plasmidique transformant se réplique normalement et la batterie des déterminants de la résistance qu'il porte est presque immédiatement exprimée.

I.6.2 – Techniques biochimiques (60)

Deux techniques biochimiques peuvent être utilisées, à savoir :

- électrophorèse en gel d'agarose de lysat bactérien
- ultracentrifugation en chlorure de césium – bromure d'éthidium

I.6.2.1. Electrophorèse en gel d'agarose

Les bactéries sont lysées, leur DNA est extrait, partiellement purifié et analysé par électrophorèse en gel d'agarose. C'est l'approche la plus simple, la plus directe et la moins dispendieuse.

Elle permet une détection et une caractérisation préliminaire du DNA plasmidique.

Cependant, l'analyse se complique très rapidement en fonction du nombre de plasmides hébergés par la souche étudiée. En effet, chaque plasmide (notamment les plus grands qui sont les plus fragiles) peut donner naissance à trois bandes dans le gel, qui correspondent respectivement :

- > à la forme native superhélicoïdale ;
- > à la forme circulaire ouverte (avec au minimum une coupure sur un des deux brins de DNA) ;
- > à la forme linéaire (par coupure vis-à-vis des deux brins de DNA).

Ces trois formes d'un même plasmide ne possèdent pas les mêmes propriétés de migration dans le gel.

I.6.2.2 – Ultracentrifugation en chlorure de césium–bromure d'éthidium

Il s'agit d'une ultracentrifugation isopycnique, faite à très haute vitesse, dans un gradient de densité de Chlorure de césium (CsCl), et à l'équilibre, les macromolécules de DNA vont occuper dans le tube une position où leur densité

apparente (ou densité de flottation) est égale à la densité locale du gradient. Les molécules de bromure d'éthidium intercalées entre les bases de DNA provoquent une diminution de densité d'environ 0,13 g/cm³ pour le DNA bicatenaire linéaire ou circulaire ouvert (relâché) et d'environ 0,09 g/cm³ par le DNA super hélicoïdal.

Après ultracentrifugation, le DNA plasmidique est recueilli par écoulement à travers un trou percé au fond du tube. Pour être utilisable, le DNA plasmidique doit être débarrassé du Bromure d'Ethidium et du Chlorure de Césium. Le DNA plasmidique ainsi purifié peut être conservé à 4°C ou congelé.

Chapitre II : RESISTANCE BACTERIENNE

II. 1 – Notion de résistance

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un phénomène dont l'étude peut être effectuée sur différents plans.

La capacité pour une souche de se multiplier dans une concentration d'antibiotiques supérieure à celle qui inhibe la majorité des souches appartenant à la même espèce, est la définition bactériologique de la résistance.

Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotiques et les voies métabolique de la bactérie. Plusieurs définitions peuvent être retenues, selon certains auteurs :

- une souche est dite "**résistante**" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration atteignable in vivo (50)

- une souche est dite "**résistante**" lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotiques notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (rapport technique n° 210 de l'OMS) (50)

- Une bactérie résiste à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de croître en présence d'une concentration significativement plus élevée de cet antibiotique (21)

- La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un caractère qui confère à cette souche la capacité de cultiver en présence d'une concentration élevée (ou inhabituelle) d'antibiotique.

La reconnaissance et la caractérisation de cette résistance peut se faire par différents procédés :

- * l'étude des paramètres de croissance en présence de concentrations progressives d'antibiotiques comparant un grand nombre de souches, permet de séparer des populations de souches qui diffèrent par leur sensibilité à l'antibiotique ;

- * la démonstration par une technique biochimique d'un mécanisme de résistance, telle la production d'enzyme inactivante ;

- * la description du support génétique de cette résistance ;
- * l'observation de l'échec bactériologique des patients soumis à la thérapeutique antibiotique

Il existe plusieurs types de résistance bactérienne aux antibiotiques.

II.2 – Différents types de résistance

II.2.1 – Résistance naturelle (72)

Elle est caractéristique d'espèce. C'est un caractère immuable présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce bactérienne. Elle correspond à l'insensibilité de la souche à l'antibiotique considéré. Cette insensibilité se manifeste d'emblée et elle est permanente chez toutes les souches de même espèce.

Les différents germes se montrent spontanément résistants vis-à-vis de tel ou tel antibiotique ; on peut citer les résistances naturelles des Staphylococcus aureus et entérobactéries aux Béta-lactamines (pénicilline, ampicilline et céphalosporines), des Streptococcus sp aux aminosides, des Proteus mirabilis aux tétracyclines.

II.2.2. Résistance acquise

Elle est bien plus préoccupante que la précédente car elle transforme avec le temps des germes sensibles à un antibiotique donné en germes résistants, par suite à un contact progressif avec cet antibiotique.

La résistance acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible, à l'inverse de la résistance naturelle qui est caractéristique de l'espèce (22) ;

ex : Escherichia coli dont 30 à 60% des souches sont résistantes aux tétracyclines : il s'agit de la résistance primaire (72).

Pour une meilleure compréhension, il convient de se rappeler que la bactérie comporte un matériel génétique double :

- d'une part, un chromosome unique indispensable à la vie bactérienne formé d'un très long filament pelotonné d'un acide désoxyribonucléique bicaténaire, celui-ci forme le noyau cellulaire et porte à la fin, un grand nombre d'informations génétiques ou gènes.

- d'autre part, en plus de ce chromosome unique, la bactérie peut héberger, dans son cytoplasme, des filaments surnuméraires d'ADN également porteurs d'informations génétiques ; ce sont les plasmides qui se repliquent indépendamment du noyau et ne sont pas indispensables à la vie bactérienne. (28)

Chez les bactéries, la résistance acquise aux antibiotiques est transmissible à la descendance. C'est donc un phénomène génétique qui se produit à deux niveaux :

- . soit le chromosome, c'est la résistance chromosomique ;
- . soit les plasmides, c'est la résistance extrachromosomique ou plasmidique.

II.3. – Mécanisme de résistance.

Nous parlerons d'abord du déterminisme génétique avant d'aborder le mécanisme biochimique de la résistance.

II.3.1 Mécanisme génétique

La résistance est gouvernée par des gènes localisés dans deux types de molécule d'ADN :

le chromosome bactérien qui apporte l'ensemble des informations propres à la cellule bactérienne et les plasmides qui sont des éléments additionnels étrangers à la cellule bactérienne pouvant être introduits par des mécanismes de transfert d'ADN d'une bactérie à une autre telle que la transduction par un bactériophage ou par la conjugaison qui établit un pont cytoplasmique entre 2 bactéries.

Ce mécanisme repose sur l'altération du matériel génétique de la cellule bactérienne. Cette altération peut toucher le matériel endogène (résistance par mutation) c'est à dire résistance chromosomique ou bien l'acquisition du matériel génétique exogène ou (résistance plasmidique) plasmide.

II.3.1.1. Résistance chromosomique = mutation

Elle intervient à la suite d'une ou de plusieurs mutations.

Les gènes bactériens peuvent être le siège de modifications dont les mutations qui sont des modifications spontanées ou induites par des agents mutagènes. Cette mutation est due à une addition, une délétion ou une substitution de bases ayant pour conséquence une erreur dans la lecture du code génétique et peut induire la résistance bactérienne aux antibiotiques par l'un des 3 mécanismes suivants :

- > par perte de perméabilité de la paroi
- > par modification de la protéine cible
- > par production d'enzyme inactivante.

Différents niveaux de résistance par mutation peuvent être décrits (1) ; on distingue :

- la résistance à un échelon avec l'exemple de Escherichia Coli face à la streptomycine. C'est également la résistance avec les rifamicines, la novobiocine, la fucidine. Ne concerne qu'un seul locus

- la résistance à échelon multiple par contre concerne la mutation de plusieurs loci.

Ex : C'est la résistance de type pénicillinique rencontrée avec les B-lactamines, les tétracyclines, le chloramphénicol, les aminosides (à l'exception de la streptomycine).

L'apport d'ADN provenant du chromosome d'une autre bactérie peut se faire par un des trois mécanismes classiques de la génétique microbienne :

- . Transformation
- . Transduction par un bactériophage
- . Conjugaison par l'intermédiaire du facteur sexuel F.

Tous ces mécanismes peuvent faire acquérir à une bactérie une résistance à un antibiotique, par exemple le gène de résistance à la streptomycine.

Les mutations chromosomiques présentent des caractéristiques à savoir :

- . C'est un phénomène rare, le taux de mutation c'est à dire la chance d'obtenir un mutant par bactérie et par génération est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-10} . Mais dans une population donnée, la fréquence observée des mutants est souvent de 10^{-6} à 10^{-9} bactéries.

- . La mutation est un phénomène indépendant de l'antibiotique.

Etant la conséquence d'une erreur se produisant au hasard au cours de la replication du chromosome, la mutation se produit indépendamment de la présence de l'antibiotique. L'antibiotique n'agit donc qu'en tant qu'agent sélecteur chargé d'éliminer les populations sensibles et permettre la croissance des rares mutants résistants.

. La mutation est un phénomène spécifique, puisqu'elle ne porte que sur le mode d'action biochimique d'une famille d'antibiotiques. Cette spécificité s'étend à tous les antibiotiques d'une même famille ayant le même site d'action ; c'est ce qui se passe dans la famille des macrolides ou des aminosides.

. Enfin les mutations sont héréditaires et stables hormis les cas rares de mutations reverses.

II.3.1.2. Résistance plasmidique

Le plasmide est constitué par de l'ADN chromosomique par sa taille plus petite (0,5 à 400 Mdal contre 200 Mdal pour le chromosome) et de sa replication autonome régie par un contrôle strict.

C'est la plus importante puisqu'elle représente 25 à 90% des résistances acquises. Elle fut découverte au Japon en 1955, à la suite d'observations suivantes (58) : des Shigelles sensibles, sont devenues simultanément résistantes à la streptomycine, au chloramphénicol, ceci par suite d'un simple contact, dans l'intestin des malades, avec des Escherichia coli résistants. L'on fut alors amené à penser à l'existence de plasmides de résistance aux antibiotiques.

Les plasmides codent pour plusieurs caractères dans la cellule mais les plasmides les plus étudiés sont ceux responsables de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds.

Il y a deux types de plasmides (32)

- les conjugatifs : autotransmissibles , ils ont une masse moléculaire supérieure à 30 Md. On les appelle aussi plasmides F ou facteurs sexuels;

- les non conjugatifs, avec une masse moléculaire comprise entre 0,5-50Md

Les plasmides peuvent être isolés par :

- transfert des caractères de résistance
- transduction
- cure
- incompatibilité

La résistance plasmidique est transférable. Les plasmides des bacilles à Gram négatif se transmettent alors à de très nombreuses espèces expliquant la diffusion de l'infection à entérobactéries dans les milieux hospitaliers.

Il faut noter dans cette dissémination de la résistance la contribution des transposons qui sont des ADN interposés entre les gènes de résistance portés par les plasmides.

Ils peuvent passer d'un plasmide à l'autre ou d'un site à l'autre du même plasmide ou bien encore se fixer sur un plasmide et le rendre résistant.

II.3.2 – Mécanisme biochimique.

Pour qu'un antibiotique soit actif sur une bactérie, il faut qu'il puisse à la fois y pénétrer, ne pas y être inactivé et trouver une molécule cible. Différents mécanismes de résistance sont connus :

- > par imperméabilité de la paroi
- > par modification des protéines cibles
- > par production d'enzymes inactivant les antibiotiques
- > par développement d'une voie métabolique se substituant à la voie métabolique inhibée par l'antibiotique.

II.3.2.1. – Par imperméabilité

Pour cela, il convient de faire un rappel sur la constitution de la paroi bactérienne :

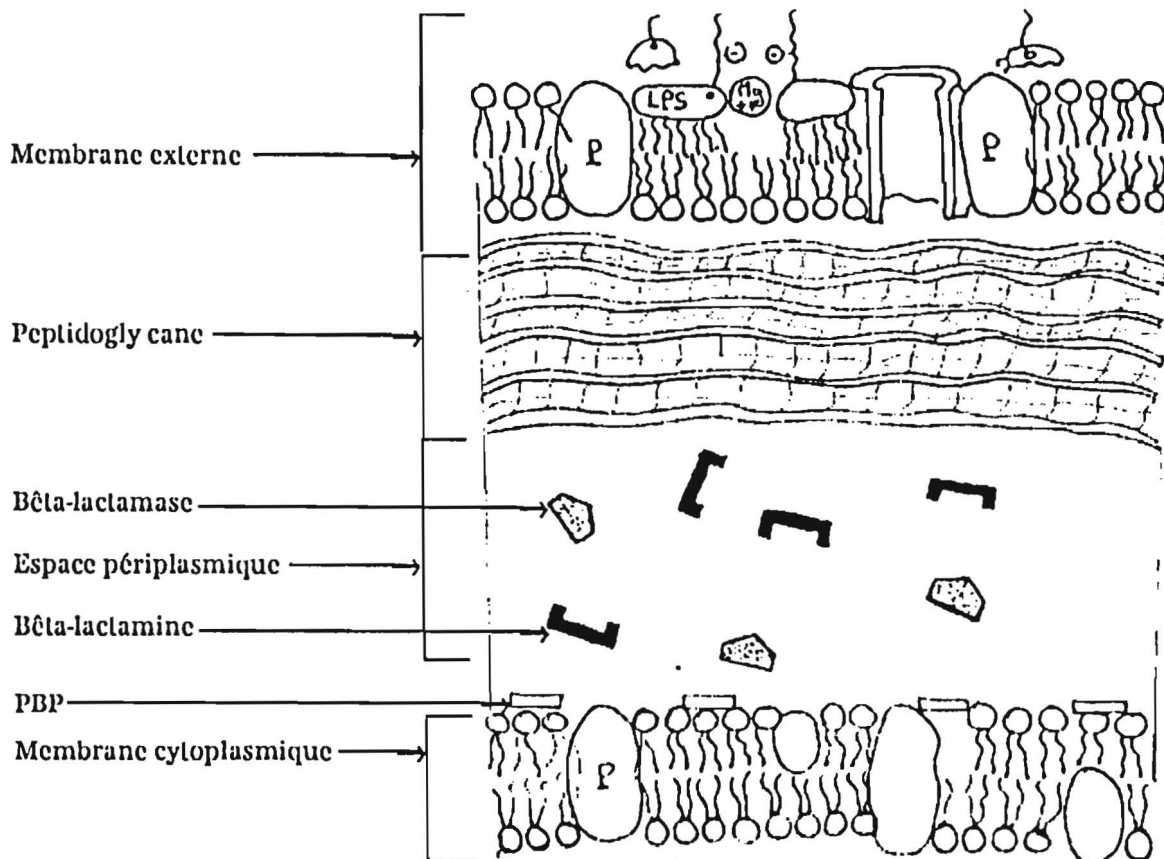
* la paroi bactérienne (10) figure: 2

La paroi bactérienne est une structure rigide qui entoure la cellule bactérienne et qui joue un double rôle de protection et de maintien de la pression osmotique.

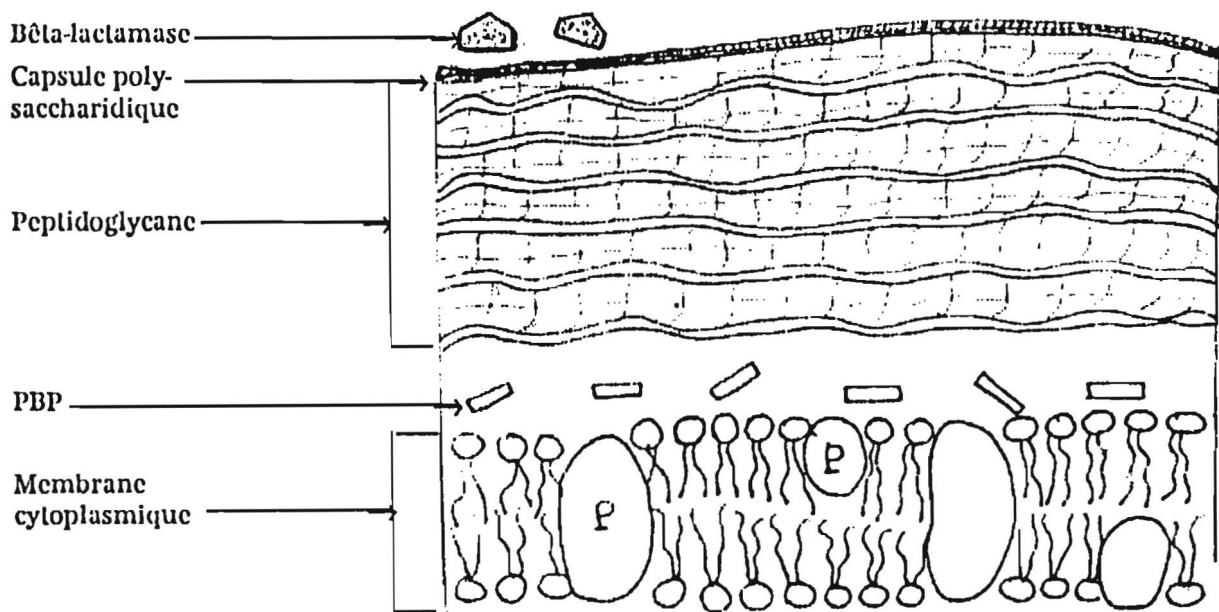
Sa composition chimique est complexe avec un élément essentiel :

le peptidoglycane ou muréine. C'est un polyside formé de chaînes linéaires de N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétylmuramique reliées par des tétrapeptides. C'est cette structure qui est responsable de la rigidité. La synthèse du peptidoglycane nécessite l'intervention de trois enzymes :

figure 2: Structure de la paroi



**STRUCTURE DE LA PAROI DES BACILLES A GRAM NEGATIF
AVEC INTRODUCTION DE BETA-LACTAMINES**



STRUCTURE DE LA PAROI DES COCCI A GRAM POSITIF

PBP : "Pénicillin - Binding - Proteins"

- . La transglycosylase qui assure la formation des chaînes polysaccharidiques,
- . la transpeptidase qui les rattache et
- . la carboxypeptidase qui joue un rôle dans la synthèse.

La paroi joue un rôle essentiel dans la coloration de Gram, et elle permet de différencier les bacilles Gram positif des bacilles Gram négatif.

La structure de la paroi permet de comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques de même que le mécanisme de résistance. Les conséquences de cette structure sont les suivantes:

Chez les bactéries à Gram positif, la muréine a une structure réticulée ce qui facilite le passage des produits.

Chez les bactéries à Gram négatif, la présence des deux membranes entraîne la traversée difficile de cette paroi et les molécules entrent dans la cellule en se servant des porines.

Le mécanisme de résistance par imperméabilité de la paroi bactérienne n'affecte pas les bactéries à Gram positif du fait de l'absence de membrane externe.

Par contre chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des Bêta-Lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. (13)

La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles, et des mutants résistants par diminution des porines ont été observés.

Les germes à Gram positif admettent ainsi deux mécanismes de résistance:

- modification des protéines cibles
- sécrétion des bêta-lactamases.

tandis que ceux à Gram négatif admettent en plus un troisième mécanisme qui est:

- la diminution ou l'absence de porines.

La résistance par imperméabilité de la paroi peut être due soit (75);

1°- à une absence d'électrons de transport avec l'exemple de la résistance de certaines souches de Streptocoques aux aminosides.

2°- à l'intervention de facteurs spécifiques à la paroi tels que la présence de capsule.

3°- à des facteurs propres aux médicaments à savoir :

- leur hydrophilie (facteur favorisant leur passage à travers les porines) ou leur hydrophobie
- la masse moléculaire
- leurs structures et charge

par exemple une souche dont la membrane est riche en polysaccharides peut se révéler hautement résistante pour des produits hydrophobes.

4°- à la présence de porines, à leur taille et à leur nombre.

A noter l'existence de 5 types de porines :

Omp C
Omp F
Lan S
Pho E
Porine K

La diminution de la synthèse de porines est le plus souvent due à une mutation chromosomique.

5°- à une production d'enzymes se liant aux antibiotiques et diminuant ainsi leur transport.

Conséquence : Les antibiotiques traversent plus ou moins bien la paroi en fonction de leur structure, ainsi :

- les antibiotiques monoanioniques ont un passage en fonction des radicaux qu'ils portent. Il s'agit de céphalosporines (Céfaloine, la Céfotaxime, la Céfopérazone, la Céftriaxone, la Céfazoline, Céfacétrile, la Céfuroxime), la Pipéracilline, la Mezlocilline;

- la présence d'une charge positive et d'une charge négative engendre une grande hydrophilie, donc une facilité de pénétration, c'est le cas de l'Ampicilline, du Céfaclor, de la Céfalexine, et de l'Imipénem;

- les céphalosporines de première génération ont une bonne perméabilité alors que celle de troisième génération, à cause de l'adjonction de certains radicaux, traversent moins bien la barrière; cela ne réduit pas leur efficacité du fait de leur relative résistance à l'hydrolyse enzymatique.

II.3.2.2. - Par modification des protéines cibles.

Les PLP (Proteines de liaison des Pénicillines) ou PBP (Penicillin Binding Proteins) sont situées sur la membrane cytoplasmique et servent de site d'action aux bêta-lactamines. En effet l'une des conditions d'action des bêta-lactamines est leur fixation à une protéine cible.

Les PLP ont été décrites avec les travaux de Spratt B. en 1975. Elles représentent les transpeptidases et carboxypeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. (91)

La liaison entre la PLP et les bêta-lactamines est durable, stable, et covalente. (94)

Cette liaison aboutit à l'action bactériostatique puis bactéricide de l'antibiotique.

la PBP est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodecyl-sulfate de sodium et son poids moléculaire varie entre 40.000 et 120.000 daltons.

Leur nombre et leur affinité aux bêta-lactamines est variable.

Tableau V : Résistance liée à des modifications des PLP chez les bactéries Gram positifs. (94)

MODIFICATIONS	ESPECES
Diminution d'affinité pour les bêta-lactamines.	C. perfringens S. pyogenes
Augmentation de la quantité d'un PLP essentielle.	E. faecalis E. faecium
Perte d'une PLP	E. faecium
Acquisition d'une nouvelle PLP	S. aureus

L'altération des PLP ainsi que des modifications au niveau du système autolytique constituent un mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. Ce mécanisme est gouverné par des gènes présents dans les plasmides et les transposons (75). Il peut être rencontré avec les antibiotiques comme les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les sulfamides, le triméthoprim, les quinolones, les rifampicines, les bêta-lactamines et les aminoglycosides.

La résistance par altération de la PBP est surtout rencontrée chez les bactéries à Gram positif qui sont dépourvues de membranes externe.

Exemple: La résistance des Entérocoques aux Céphalosporines de troisième génération serait due à une altération des PBP.

Chez les bactéries à Gram négatif, le mécanisme de résistance est complexe et une résistance due exclusivement à l'altération des PLP est rare (on la décrit avec Haemophilus et Neisseria gonorrhoeae).

II.3.2.3. Mécanisme d'action enzymatique de la résistance bactérienne. (75,5,8)

La détoxification est un mécanisme de résistance très répandu qu'on peut facilement mettre en évidence. Presque toutes les familles d'antibiotiques peuvent être dégradées par des enzymes.

1° Les bêta-lactamines.

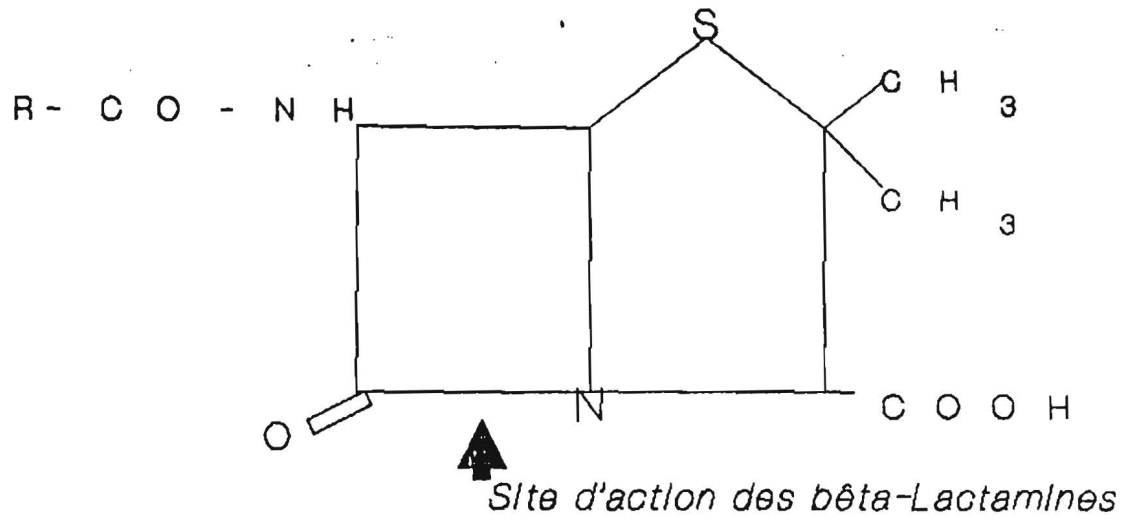
Plusieurs enzymes sont rencontrés à savoir:

- les Pénicillinases et Céphalosporinases qui constituent les bêta-lactamases.

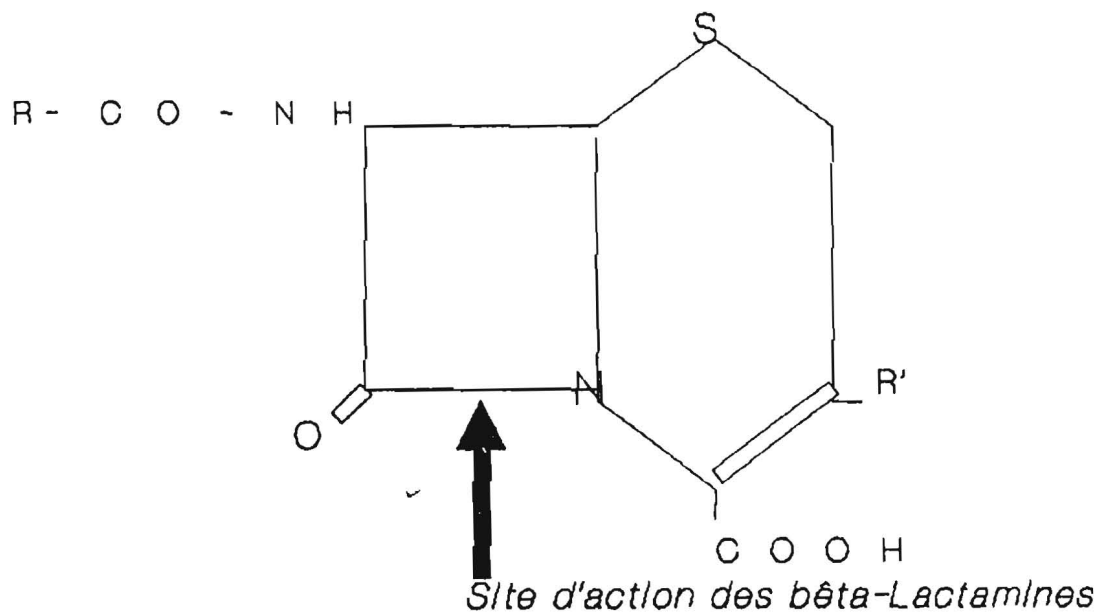
Ces enzymes hydrolysent les bêta lactamines avec ouverture du cycle bêta-lactame, et production de dérivés inactifs. Les différentes bêta-lactamases ont une affinité plus grande soit pour les Pénicillines soit pour les Céphalosporines, et la résistance croisée entre les deux groupes de bêta-lactamines n'est habituellement pas complète.

Toutes les bêta-lactamases hydrolysent le cycle bêta-lactame mais ce sont des molécules distinctes, avec des propriétés physicochimiques totalement différentes. (figure 3)

**Figure 3: Mécanisme de résistance des
bêta-lactamines**



Pénicilline



Céphalosporine

Les gènes codant pour la production de bêta-lactamase peuvent être localisés soit sur le chromosome bactérien, soit sur un plasmide R;

- Les estérases qui coupent la chaîne latérale des Céphalosporines;

- Les amidases qui hydrolysent aussi bien les Céphalosporines que les Pénicillines pour libérer l'acide 7-aminocéphalosporanique et l'acide 6-aminopénicillinique. On les rencontre chez les bactéries à Gram négatif seulement.

CHAPITRE III: LES BETA-LACTAMASES

III.1 – RAPPEL SUR LES BETA- LACTAMINES .

Depuis dix ans la famille des bêta-lactamines s'est considérablement agrandie. De nouvelles molécules naturelles, semi-synthétiques sont apparues. Certaines sont à l'étude (Pénem) d'autres déjà commercialisées. Elles diffèrent les unes des autres par les chaînes latérales substituant: (89)

- l'acide 6-aminopénicillanique (6 A P A) des pénicillines
- l'acide 7-aminocéphalosporanique (7 A C A) des céphalosporines.

Ces bêta-lactamines possèdent un certain nombre de propriétés communes à savoir:

- . la présence du cycle bêta-lactame qui est le support de l'activité antibactérienne.
- . un mode d'action identique: inhibition de la synthèse du peptidoglycane, constituant de la paroi des bactéries, par fixation élective sur les cibles enzymatiques de la membrane cytoplasmique appelées PLP.
- . Une faible toxicité.

Sur le plan structural, le cycle bêta-lactame est isolé chez les monobactams, accolé à un hétérocycle pentagonal chez les pénicillines, hexagonal chez les céphalosporines.

- . Leur affinité pour les protéines cibles est variable.
- . Elles sont dégradées par les bêta-lactamases.

La structure des bêta-lactamines permet de distinguer 6 groupes dont 2 regroupés (12,55).

- * Les céphems
- * Les pénems et les carbapénems
- * Les monobactams
- * Les clavams
- * Les pénams

III.1.1- Céphems. (fig.4)

Le noyau central Céphem est commun aux dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique, et les différentes substances diffèrent entre elles par les substitutions effectuées sur le carbone 3 et le carbone 7 de ce noyau.

Les substitutions en 3 modifient les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques de la molécule tout en renforçant les propriétés antibactériennes vis-à-vis des Staphylocoques et des Pseudomonas.

Les substitutions en 7 modifient les propriétés antibactériennes et la stabilité de la molécule.

Dans ce groupe on distingue:

- Les céphamycines
- Les oxacéphems
- Les céphalosporines.

Les céphalosporines sont des Bêta-lactamines hémisynthétiques obtenues à partir de la Céphalosporine C, substance extraite d'un champignon: Cephalosporium acremonium, en 1945 par le professeur Brotzu.

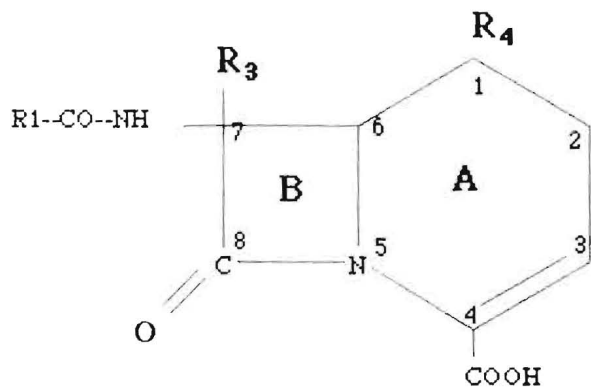
L'aboutissement fut la mise en évidence du noyau central de cette substance: 7 ACA. Ce fut le point de départ de la mise en évidence de nombreuses Céphalosporines.

Depuis la découverte de la céphalotine en 1962, les Céphalosporines ont connu un essor considérable avec la mise au point d'un nombre impressionnant de produits de qualité croissante.

Dans les six dernières années, le spectre d'activité antimicrobien de ces antibiotiques s'est énormément accru par la mise sur le marché, en deux vagues successives, de molécules très performantes, les Céphalosporines dites de 2nd génération, puis celles dites de 3^{ème} génération.

L'existence actuelle d'une trentaine de spécialités de Céphalosporines rend nécessaire un essai de classification.

Ainsi plusieurs classifications ont été proposées.



A = cycle dihydrothiazine

B = cycle β -lactame

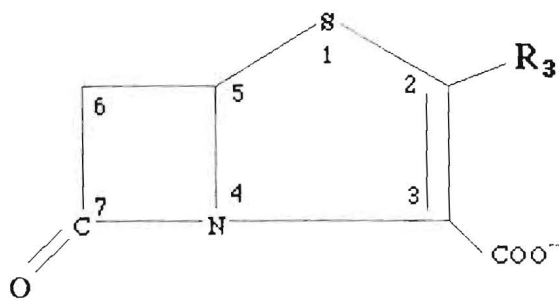
Si $R_4 = S \Rightarrow$ Céphalosporines

Si $R_4 = O \Rightarrow$ Oxacéphem

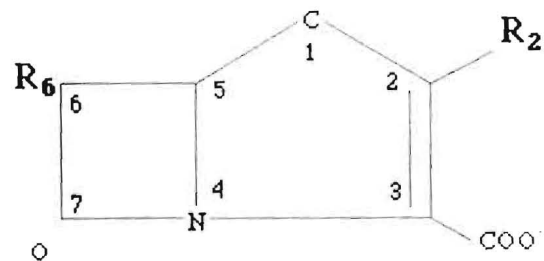
Si $R_4 = OCH_3$ 7 alpha méthoxy $\Rightarrow$ céphamycines

Radicaux céphem	Fonction
R_1 R_2 R_3	Résistance aux β lactamases
R_1	Activité intinsèque accrue
R_2	Modification des propriétés photocinétiques

FIGURE 4: Noyau céphem



Noyau: Cephem

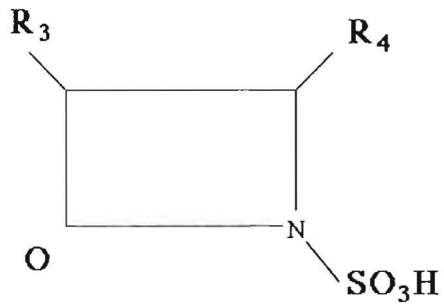


Noyau: Carbapénem

FIGURE 5: Pénem et carbapénem

37 bis

R_3 : Responsable de la stabilité
aux β lactamases et de
l'affinité pour les protéines
cibles

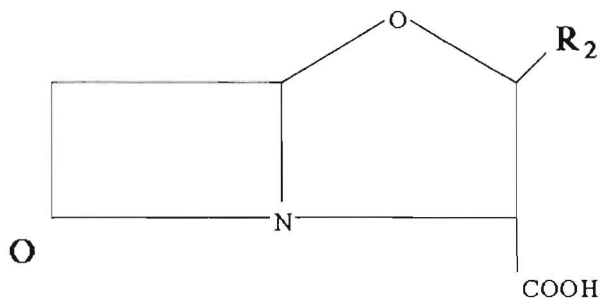


Si R_3 = Δ minothiazole - carboxy-
propyloximino

Si R_4 = $--CH_3$ (méthyl)

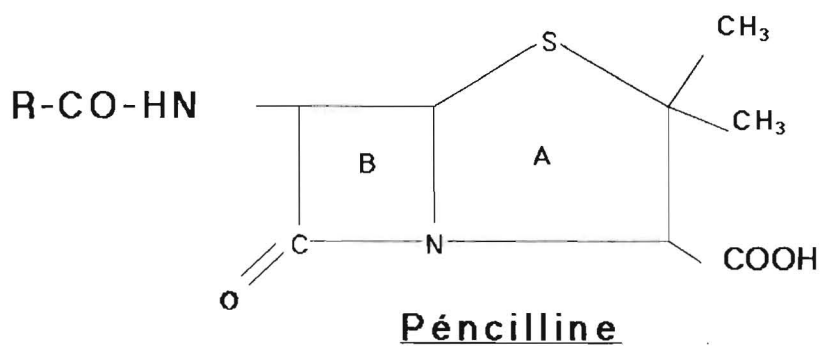
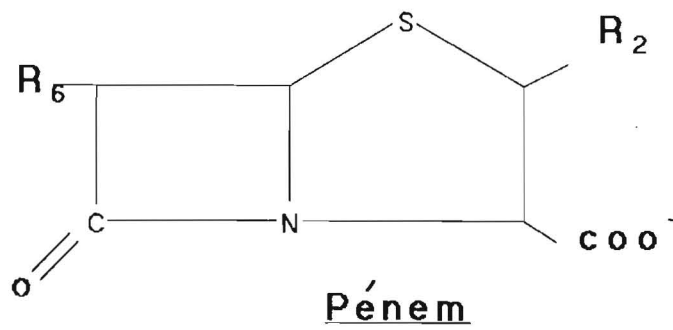
AZTREONAM (AZACTAM)

FIGURE 6: Monobactam



Si: $R_2 = CH--CH_2OH \implies$ Acide clavulanique

FIGURE 7: Noyau clavam



A = Cycle thiazolidine

B = Cycle β -lactame

Si: $R_2 = \text{CH-CH}_2\text{OH} \Rightarrow$ Acide clavulanique

FIGURE 8: Noyau pénam ou pénicilline

III.1.1.1. Classification de WISE.

WISE subdivise les Céphalosporines en trois catégories:

- . Les Céphalosporines orales ou alpha-aminées (Tableau VI a)
- . Les anciennes Céphalosporines injectables (Tableau VI a)

Tableau n° VI a : Classification des céphalosporines orales et anciennes céphalosporines injectables de WISE

ORALES			INJECTABLES ANCIENNES					
			Sensibles aux bêta-lmases plasmidiques ^{et} aux Cases			Stables vis-à-vis de certains bêta-lactamase		
	1/2V (h)	LP (%)		1/2V (h)	LP (%)		1/2V (h)	LP (%)
CEFALEXINE	0,9	20	CEFALOTINE	0,6	72	CEFOXITINE	0,7	75
CEFRADINE	0,9	20	CEFACETRILE	0,6	35	CEFAMANDOLE	0,8	70
CEFACTOR	0,9	25	CEFAPIRINE	0,6	48			
CEFROXADINE	0,9	10				CEFUROXIME	1,4	35
			CEFALODRINE	1,3	20			
CEFADROXIL	1,6	20	CEFAZOLINE	1,8	80			

.1/2V (h) = demi-vie en heure

.LP (%) = Pourcentage de liaison aux protéines

. Les nouvelles Céphalosporines injectables résistantes
aux bêta-lactamases. (tableau VI b)

**Tableau VI b : Classification des nouvelles
Céphalosporines
injectables
selon WISE (27)**

INJECTABLES RECENTES								
Bonne activité sur bacilles à gram (-) sauf <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> .			Très bonne activité sur bacilles à gram (-) sauf <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>			Bonne activité sur <u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
	1/2V (h)	LP (%)		1/2V (h)	LP (%)		1/2V (h)	LP (%)
CEFOTAM	0,75	40	CEFOTAXIME	0,9	35	CEFSULODINE	15	34
			CEFMENOXINE	0,9	52	CEFOPERAZONE	1,7	90
						CEFTAZIDIME	1,8	17
			CEFTIZOXIME	1,4	30			
			CEFTAZIDIME	1,8	17			
			CEFOPERAZONE	1,7	90			
			LATAMOXEF	2,5	40			
			CEFTRIAXONE	8	95			

III.1.1.2. Classification de O'CALLAGHAN.

Les Céphalosporines sont classées en 7 groupes biologiques.

5 groupes correspondent aux Céphalosporines utilisées en médecine humaine.

Ces groupes sont subdivisés selon la voie d'administration, la sensibilité aux bêta-lactamases, la présence ou l'absence de métabolites, l'activité antipyocyane.

Le 6ème groupe est celui des Céphalosporines à usage vétérinaire.

TABLEAU VII: Classification biologique des céphalosporines selon O' COLLAGHAN (27)

MEDECINE HUMAINE

PARENTERALE

ORALE

β -lactamase sensible

stable aux β lactamases

β lactamase sensible

stable aux β lactamases

Groupe 5

Groupe 3

Groupe 4

Présence de
microbolites

Absence de
microbolites

(a) Cefuroxime
Céfamandole
Céfonicide

Céfatexine
Céfradine
Céfaclor
Céfadroxil

FR 17027

Groupe 1

Groupe 2

Cefalotine
Céfapirine
Céfacétrine
Célotiam

Céfalaridine
Céforanide
Céfanide

(b) Céfoxime
Cefménoxime
Céfodizime
Ceftriaxone

(c) antipyocyanique
Cefsulodine
Céfopérazone
Ceftazidime

(d) Céphomycines
Céfotixine
Cefmétazole
Céfotétan
Latamoxef

MEDECINE VETERINAIRE

REACTIFS BIOLOGIQUES

Groupe 6

Cefoxazole
Céphalonium

Groupe 7

Nitrocephine
Padac
Centa

III.1.1.3 Classification en "génération"

Elle est réalisée d'après des données bactériologiques repose sur plusieurs critères:

- . largeur du spectre antibactérien et stabilité aux bêta-lactamases,
- . pouvoir intrinsèque d'activité antibactérienne sur les entérobactéries (et sur Pseudomonas aeruginosa pour certaines),
- . activité vis-à-vis des enterobactéries du groupe Klebsiella, Enterobacter.

* Céphalosporines de 1^{ère} génération

Ex: Céfalotine, Céfaloridine, Céfazoline, Céfalexine...

- . Elles ont en commun le même spectre.
- . Elles sont actives vis-à-vis des enterobactéries non productrices de Céfinases.
- . Elles sont très efficaces sur les Staphylocoques Méthi-S.
- . Elles diffusent très bien à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

* Céphalosporines de 2nd génération

Ex: Céfuroxime, Céfamandole, Céfoxitine, Céforanide...

- . Le pouvoir antibactérien de ces Céphalosporines est supérieur à celui des Céphalosporines de 1^{ère} génération.
- . Le spectre est élargi vis-à-vis de certaines enterobactéries (Klebsiella, Providencia, Enterobacter, Serratia, Citrobacter), ainsi que sur les Haemophilus, et les Gonocoques producteurs de bêta-lactamases.
- . Elles résistent mieux que les Céphalosporines de 1^{ère} génération à la dégradation par certaines bêta-lactamases.

- . Leur spectre n'est pas croisé entre les différentes molécules.
- . Elles sont inactives sur Pseudomonas aeruginosa.
- . Elles pénètrent moins bien la paroi des bactéries à Gram négatif que les Céphalosporines de 1 ère génération.

* Céphalosporines de 3ème génération

Ex: Céfotaxime, Céftriaxone, Ceftazidime, Cefopérazone, Cefsulodine, Latamoxef, Céfozidime...

- . Les Céphalosporines de 3ème génération sont très stables à la dégradation par les bêta-lactamases.
- . Leur spectre est élargi vis-à-vis des entérobactéries résistantes aux Céphalosporines de 1ère et de 2ème génération.
- . Elles sont actives sur Serratia, Enterobacter, Providencia.
- . Leur action sur Pseudomonas est variable selon les molécules.
- . Le spectre n'est pas croisé entre les molécules.
- . Très bon quotient inhibiteur (rapport concentration sanguine/CMI).
- . L'activité de ces Céphalosporines sur les Staphylocoques est inférieur aux Céphalosporines de 1ère génération.
- . Actuellement, on dénombre trois générations en France et quatre en Allemagne.

Après la classification en générations de ces Céphalosporines, nous en retenons de nouvelles telles que: (57,26,25,48,27)

- . Cefepime et Cefpirome
- . Cefcanel
- . GR 69153
- . Cefquinome
- . S 1108

Ces nouvelles céphalosporines ont une grande activité sur les entérobactéries avec un taux de 90 %. Elles sont également toutes actives sur les cocci à l'exception de la GR 69153.

La S 1108, la Cefpirome et la Cefquinome présentent une meilleure activité sur les souches de Staphylococcus aureus à coagulase négative, sur la majorité des Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, M.S.S.A. et Streptocoques A, B, C, F, G.

L'inconvenient majeur de ces céphalosporines est l'hydrolyse de leur cycle par les bêta-lactamases de type TEM-3, TEM-5, TEM-9 et celles de type PS-1, PS-4 seulement rencontrées avec la S 1108.

III.1.2 – Pénems et Carbapénéms (figure 5)

Le noyau pénem est caractérisé par un pentacycle non saturé (double liaison en 2,3).

Un produit est actuellement en cours d'étude: Sch 29482. C'est un pénem résistant aux bêta-lactamases, grâce au radical hydroxy-éthyl en 6 alpha et administrable par voie orale grâce au radical éthyl-thio en R2.

Chez la Thiénamycine (Carbapénem), le groupement hydroxy-éthyl en C6 protège la molécule de l'hydrolyse des bêta-lactamases et augmente l'activité vis-à-vis de Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter, Serratia et Citrobacter.

Le dérivé N-formimidoyl-thiénamycine est plus stable in vivo que la Thiénamycine.

III.1.3 – Monobactams (34,45) figure 6

Ce sont des bêta-lactamines monocycliques, de découverte récente et dont l'unique représentant est l'Aztréonam (AZACTAM).

Il a été synthétisé en 1987 et commercialisé en 1988.

Il est isolé d'une bactérie (*Chromobacterium violaceum*), ce premier monobactam a conduit à la synthèse de l'Aztréonam molécule qui, par de nombreux aspects est unique parmi les bêta-lactamines.

Il n'a en commun avec les Pénicillines et les Céphalosporines que le cycle bêta-lactame, sans pour autant perdre l'efficacité que l'on croyait liée au noyau bicyclique.

III.1.4 – Clavams (figure 7)

Le noyau clavam dérive du noyau pénam par substitution du soufre en position 1 par un oxygène.

C'est l'Acide Clavulanique, inhibiteur des bêta-lactamases. Deux molécules sont associées actuellement à l'Acide Clavulanique:

- l'Amoxicilline
- la Ticarcilline.

III.1.5 – Pénams ou Pénicillines

(figure 8)

Le mot pénicilline fut donné par le professeur Sir Alexandre FLEMING à une substance à propriété antibactérienne élaborée par un champignon: Penicillium notatum qui s'opposait à la croissance de staphylocoques dorés en culture sur boîte de Pétri.

Le terme désigne par la suite une famille d'antibiotiques obtenus par hémisynthèse à partir de l'acide amino-6-pénicillanique(6 APA) commercialisé en 1946, cette pénicilline présenta des insuffisances au bout de quelques années:(96)

- fugacité d'action
- instabilité en milieu gastrique
- étroitesse du spectre antibactérien
- hydrolyse du cycle bêta-lactame par les pénicillinases.

La famille des pénams comprend:

- la Pénicilline G
- l'Ampicilline
- la Carbénicilline
- Péni hémi synthétique (Méthicilline, Oxacilline, Floxacilline, Flucloxacilline)
- Carboxypénicilline (Carboxicilline)
- Uréidopénicilline (Mezlocilline, Aztocilline, pipèracilline).
- l'Acide pénicillanique sulfo. (Permécilline).

III.2 - Les bêta-lactamases.

Les enzymes diffèrent, suivant la nature de la bactérie productrice.

Les bactéries à Gram positif telles que Staphylococcus aureus, ne synthétisent une bêta-lactamase que dans la mesure où l'antibiotique, la bêta-lactamine est présent: l'enzyme inductible est produite en grande quantité et est libérée dans le milieu extérieur.

Les bactéries Gram négatif produisent des bêta-lactamases en générale constitutives, en quantité réduite (environ 100 fois moins que les bactéries Gram positif), l'enzyme n'étant pas libérée dans le milieu extérieur mais restant dans l'espace périsplasmique.

De plus, les bactéries Gram négatif peuvent posséder deux types de bêta-lactamases, l'une codée par le chromosome, l'autre par un plasmide. (75)

L'étude plus complète de ces enzymes a fait prendre conscience de leur diversité: diversité de leur spectre d'activité, regroupé dans le tableau VIII, autour des pénicillines (pénicillinases) et des céphalosporines (Céphalosporinases),
 • diversité de leur origine génétique, de leur mécanisme de production (74,87).

Sur le plan génétique, les bêta-lactamases des bactéries Gram négatif peuvent-être de déterminisme chromosomique ou plasmidique. Elle sont inductibles ou constitutives, c'est à dire biosynthétisées en l'absence d'inducteur.

Tableau IX

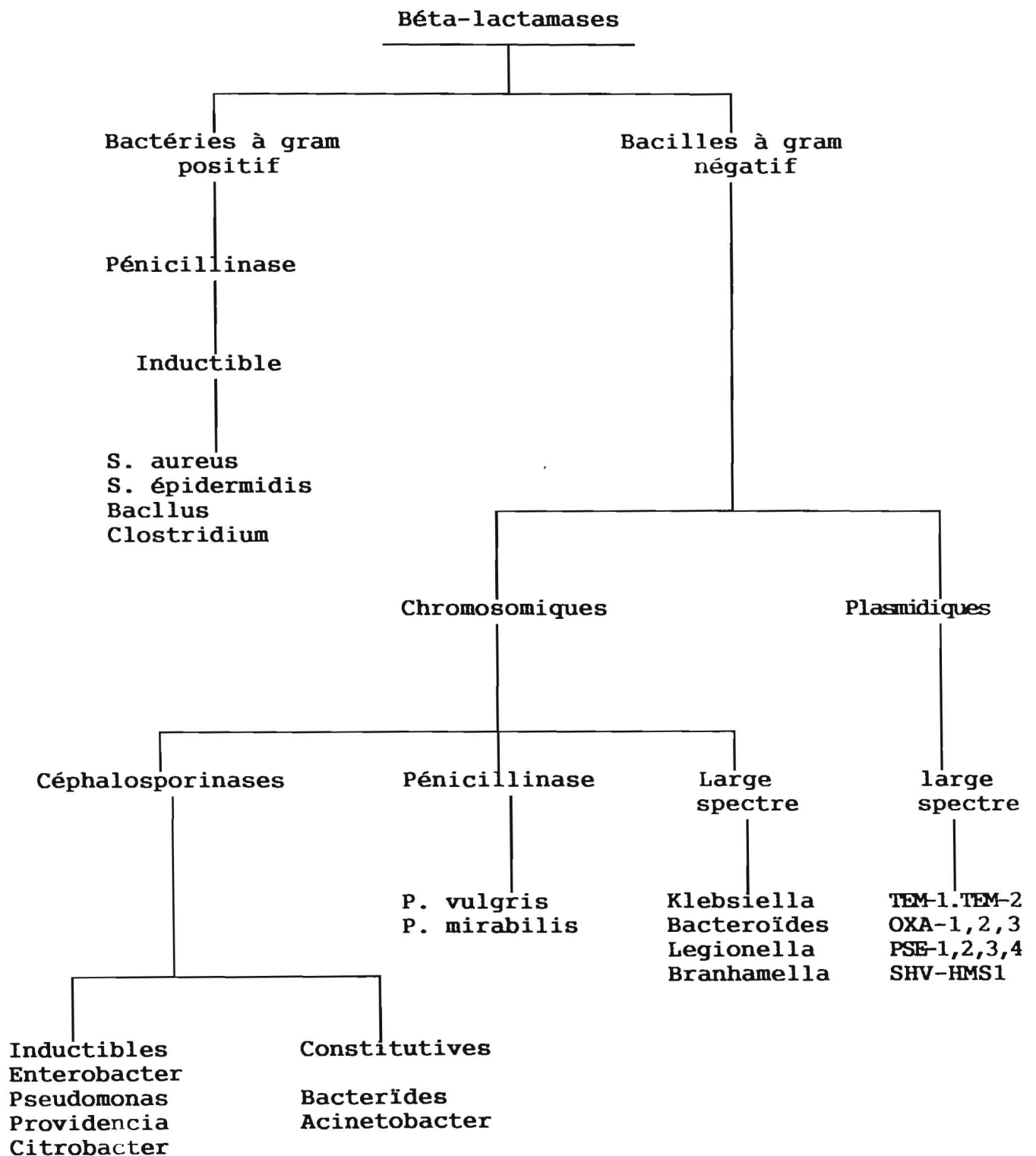
1°- Les bêta-lactamases plasmidiques sont synthétisées de façon constitutive à un niveau d'expression généralement élevé. Une dizaine d'enzymes sont actuellement bien définies sur des plasmides de bactéries Gram négatif.

. Les bêta-lactamases TEM-1, TEM-2, SHV-1 et HMS-1, enzyme à large spectre, ont une activité d'hydrolyse identique touchant l'ampicilline, la carbénicilline, et les céphalosporines, de 1^{ère} ou 2nd génération, selon le niveau de biogénèse. L'enzyme TEM-1 est de loin la plus répandue chez les entérobactéries, les Haemophilus et les gonocoques. Les gènes codant pour TEM-1, TEM-2, SHV-1 et HMS-1 ont été décrits sur des transposons qui sont des gènes <<sauteurs>> passant d'un plasmide à l'autre ou d'un plasmide à un chromosome.

Tableau VIII: Les différentes bêta-lactamases produites par les bactéries

Bêta-lactamases actives	Plasmide/bactérie synthétisant les bêta-lactamases	Localisation du gène bla	Synthèse inductible (i) constitutive (c)
Pénicillinase II	Staph. aureus P.mirabilis GN310	Plasmide Chromosome	i c
Pénicillinase PSE-1 PSE-2 PSE-3 PSE-4	RPL11 R151 Rms149 pMG19	plasmide plasmide plasmide plasmide	c c - c
Céphalosporinase Ia Id	Enterobacter cloacae P99 nombreuses enterobacteries P. aeruginosa NCTC8203 Bacteroides fragilis	chromosome chromosome chromosome chromosome	c i(c) i c
Pénicillinase Va OXA-1 Vb OXA-2 V OXA-3	RGN 238 R46 R57b	plasmide plasmide plasmide	c c c
Pénicillinase IIIa TEM-1 IIIa TEM-2 SHV-1 SHV-1 IVc	R6K RP1 p453 R997 Klebsiella aerogenes 1082E	plasmide plasmide plasmide plasmide chromosome	c c c c c

Tableau IX: Les différentes Béta-lactamases



Le type HSV-1 se distingue du type TEM par des propriétés immunologiques et par la sensibilité aux inhibiteurs comme le paradichloromercuribenzoate (PCMB).

. Les bêta-lactamases OXA-1, OXA-2, OXA-3 hydrolysent les isoxazoly-pénicillines et l'ampicilline plus que la céphaloridine.

. Les bêta-lactamases PSE-1, PSE-2, PSE-3, PSE-4, hydrolysent plus l'ampicilline que la céphaloridine. Elles sont essentiellement retrouvées chez Pseudomonas aeruginosa et sont responsables de la résistance à la carbénicilline.

Parmi les souches de Pseudomonas aeruginosa résistantes à la carbénicilline et bêta-lactamases positives, les fréquences des différentes bêta-lactamases constitutives sont respectivement de: PSE-1 (Carb-2) 53,8%, OXA 30,5%, et TEM 8,7%.

2° - Les bêta-lactamases chromosomiques des bacilles à Gram négatif sont soit des pénicillinases, soit des céphalosporinases.

. Les pénicillinases chromosomiques (en fait à large spectre) sont retrouvées chez Klebsiella et Branhamella catarrhalis qui sont ainsi naturellement résistantes à l'ampicilline et à la carbénicilline.

. Les céphalosporinases chromosomiques qui hydrolysent préférentiellement les céphalosporines de 1ère ou 2nd génération mais aussi l'ampicilline, sont produites en quantité variable chez les Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Proteus et Pseudomonas. Si ces bactéries deviennent des <<mutants dérégimés>> de leur céphalosporinase (production de céphalosporinase 100 à 1.000 fois plus élevée), elles seront alors résistantes à l'ensemble des céphalosporines de 3ème génération. (53)

III.3 -Structure-Origine-Localisation des bêta-lactamases.

Les bêta-lactamases sont des enzymes qui se définissent par rapport à leur cible ou site d'action, c'est à dire les bêta-lactamines, principale famille d'antibiotiques qui ont en commun le cycle bêta-lactame.

L'origine ou la biogénèse permet la distinction entre les bêta-lactamases inductibles (Pénicillinase de Staphylococcus aureus; Céphalosporinase de bacille à Gram négatif) et celles constitutives c'est à dire biosynthétisées en l'absence d'inducteur (Pénicillinase des bacilles à Gram négatif).

La localisation est soit exocellulaire (germes à Gram positif) soit périplasmique c'est à dire au niveau de la paroi bactérienne (germes à Gram négatif).

III.4 – Mécanisme d'action des bêta-lactamases.

Ces enzymes agissent par ouverture du noyau Lactam, ce qui a pour effet d'entraîner l'inactivation de l'antibiotique. Il s'agit d'un des principaux facteurs de la résistance bactérienne à l'égard des bêta-lactamines. (figure 3)

III.5 – Classification des bêta-lactamases.

De nombreux paramètres contribuent à l'individualisation et à la classification des bêta-lactamases à savoir:

- l'activité enzymatique
- profil d'activité (V_{max})
- constante d'affinité (K_m)
- inhibiteurs enzymatiques
- point isoélectrique
- poids moléculaire
- déterminisme génétique.

La classification de Richmond et Sykes a été la 1ère référence. Au moyen de ces différents critères, Richmond et Sykes ont distingué 5 classes de bêta-lactamases. (Tableau X)

Tableau X : Classification des bêta-lactamases des bacilles à Gram (-) de Richmond et Sykes (10)

MEDIATION	TYPE	CLAS.	IND.	Principaux germes
CHROMOSOMIQUE	CEPHALOSPORINASE	I	+	Enterobacter, Proteus Serratia, Citrobacter
		I	+	E. coli, S. sonnei, B. fragilis
	PENICILLINASE	II	-	P.mirabilis,
	LARGE SPECTRE	IV		Klebs., Bacteroïdes
PLASMIDIQUE	TEM	III	-	TEM-1 . TEM-2
	OXA	V	-	Oxa-1. Oxa-2. Oxa-3. Oxa-4. Oxa-5. Oxa-6.
	PSE		-	PSE-1. PSE-2. PSE-3. PSE-4.

- La classe I : Céphalosporinases d'origine chromosomique de la plupart des Pseudomonas et de certains entérobactéries.
- La classe II : Pénicillinases d'origine chromosomique de Proteus mirabilis.
- La classe III: Bêta-lactamases de type TEM d'origine plasmidique.
- La classe IV : Bêta-lactamases chromosomiques à large spectre qui existent chez Klebsiella et Bacteroïdes .
- La classe V : groupe hétérogène regroupant les bêta-lactamases OXA et PSE.

Mais il existe une autre classification des bêta-lactamases à large spectre déjà connue, modifiée par Payne et Amyes (63,93).

(Tableau XI)

Tableau XI: Nomenclature des relations existant entre les différentes classifications (10)

Mattew	Mitsuhashi	Pitton	Lab. et Phil.	Rich. et Syk.
C. ase	C. ase			I
TEM-1	Type I a	TEM-1, type 1		III a
TEM-2	Type I b			III a
SHV-1		TEM-1, type 2		IV
HMS-1				
OXA-1	Type II			Va
OXA-2	Type III			Vb
OXA-3				V
OXA-4				
OXA-5				
OXA-6				
PSE-1	Type IV		Carb-2	V
PSE-2				V
PSE-3			Carb-4	Ve
PSE-4			Carb-1	Vd

* TEM: D'après Temoniera: non du malade chez qui la première souche a été isolée.

* SHV: Sulphydryl variable.

* HMS: Hedges, Mattew et Smith.

* PSE: Pseudomonas specific enzyme.

* Case: Céphalosporinase.

Tableau IX: CLASSIFICATION DEJA CONNUE DES BETA-LACTAMASES A LARGE SPECTRE MODIFIE PAR PAYNE ET AMYES.

GROUPES	NOMS	ANNEES	REF.
1 "WEAK CEFOTAXIMASES"	TEM-E1 TEM-E2 TEM-E4 TEM-7 CAZ-3 CAZ-10	1987 1982 NS NS 1987 1988	67 66 63 41 82
2 "CEFTAZIDIMASES"	TEM-E3 TEM-6 TEM-9 TEM-10 CAZ-7 CAZ-hi	1987 1986 NS 1988 1988 1988	64 6 70
3 a "STRONG CEFOTAXIMASES" TEM-DERIVED	TEM-E3 TEM-E4 TEM-5 CAZ-2 CAZ-6	1984 1986 1987 1987 1988	83 62 68 23 23
3 b "STRONG CEFOTAXIMASES" SHV-DERIVED	SHV-2 SHV-3 SHV-4 SHV-5	1983 1985 1987 1987	49 46 40
3 c "STRONG CEFOTAXIMASES" UNKNOWN-DERIVED	FEC-1 DJP-1	NS 1988	52 65
4 "BROAD SPECTRUM CEFALOSPORINASE" CLAVULANIC ACID	BIL-1	1989	95
NOT BEING GROUPED	FUR MJ-1 MJ-2 UNAMED-1 UNAMED-2	1988 NS NS 1986 1988	35 35 35 31 85

Chapitre I: Cadre de l'étude

I. 1. Hôpital Aristide le DANTEC

Nous avons réalisé ce travail au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide le DANTEC (HALD).

L'Hôpital Central de Dakar ou Hôpital "Indigène" fût créé en 1912 à la limite de la Corniche Est de Dakar.

Cette infrastructure sanitaire est baptisée Hôpital Aristide le Dantec à la mémoire du parrain qui fut le Directeur de l'école de médecine. Elle constitue depuis 1962 avec l'Hôpital de FANN et le Centre National de Transfusion Sanguine, le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Dakar.

L'Hôpital comprend différents services à savoir :

*** Services cliniques**

- cancérologie
- cardiologie
- chirurgie générale
- dermatologie
- gynécologie - obstétrique
- médecine interne
- ophtalmologie
- ORL
- pédiatrie
- pharmacie
- radiologie
- stomatologie
- urologie

*** Services biologiques**

- anatomie - pathologie
- bactériologie - virologie
- biochimie
- cytologie et développement humain
- parasitologie

*** Services administratifs**

I.2- Le laboratoire de Bactériologie-Virologie

Le laboratoire est subdivisé en deux bâtiments. Celui destiné à la bactériologie a subi des réfections et comprend :

- une réception et deux salles de prélèvement
- une salle de stérilisation
- une salle de réunion
- un laboratoire proprement dit destiné aux analyses de routine
- divers bureaux annexés le plus souvent aux laboratoires où s'effectuent des recherches spéciales dont un destiné aux travaux de thèse.

Le deuxième bâtiment abrite la virologie.

Le personnel comprend :

- des médecins
- des pharmaciens
- des techniciens
- des informaticiens et statisticiens
- des infirmières chargées du prélèvement
- du personnel technique

Les activités de routine du laboratoire comprennent les manipulations utilisant les techniques classiques de bactériologie, c'est-à-dire :

- l'isolement
- l'identification
- et la recherche de la sensibilité des souches

A ces activités, s'ajoutent les recherches d'agents spéciaux tels :

- Chlamydia trachomatis, Mycoplasma
- Bordetella pertussis
- Haemophilus ducreyi

Des sérologies tréponémiques, HIV et HBS pour l'hépatite virale B y sont effectuées.

Chapitre II: Méthodologie

II. 1—Souches bactériennes

Notre étude portera sur un ensemble de 188 souches bactériennes qui ont été choisies en fonction de leur profil de résistance lors des tests de détection (céfinase) ou antibiogramme.

Ainsi, nous avons retenu les souches qui présentent une résistance à 1 ou plusieurs antibiotiques de la famille des B-lactamines.

Les souches testées comprennent des cocci et des bacilles, avec la répartition suivante : (Tableau XIII)

Concernant l'origine, les souches proviennent de différents produits pathologiques , à savoir

- Pus
- LCR
- Sang
- Selles
- Urines
- ORL (Pus d'otite, Gorge, Liquide pleural, Expectations, Crachats)

Ces souches ont été conservées dans un tube contenant du PBS (phosphate BUFFER solution) + glycérol à 30% cela comme source de carbone et à -70° C.

Elles ont été isolées entre 1991 et 1993.

II.1.1 – Répartition globale des souches bactériennes

Tableau XIII : Répartition globale des souches bactériennes

SOUCHES	ESPECES	NOMBRE
Staphylococcus	epidermidis	11
Staphylococcus	aureus	
	Méti-R	14
	Méti-S	14
Enterococcus	faecalis	16
Pseudomonas	aeruginosa	18
Escherichia	coli	21
Enterobacter	cloacae	14
	agglomerans	5
	gergoviae	1
Shigella	dysenteriae	3
	flexneri	8
	sonnei	3
Klebsiella	pneumoniae	19
Salmonella	typhi	9
	enteritidis	1
	Spp	2
Proteus	Mirabilis	14
	vulgaris	4
	penneri	1
Haemophilus	influenzae	10

II.1.2-Répartition des souches suivant la nature du prélèvement

Tableau XIV: Répartition des souches bactériennes selon le produit pathologique.

NATURE DU PVT ESPECES	PUS	LCR	P.O	SANG	URINES	SELLES	ORL*
MRSA N=14	11	-	-	1	2	-	-
MSSA N=14	11	-	-	2	1	-	-
Shigella N=14	-	-	-	-	-	14	-
Enterobacter N=20	1	1	-	16	1	1	-
St. epidermidis N=11	2	-	-	5	4	-	-
Ps. aeruginosa N=18	4	-	5	-	9	-	-
Kl. pneumoniae N=19	-	-	-	9	3	-	7
Salmonella N=12	-	-	-	10	-	2	-
E. coli N=21	2	-	-	3	9	3	4
Proteus N=19	13	-	1	-	1	1	3
E. faecalis N=16	13	-	1	-	2	-	-
H. influenzae N=12	2	8	-	-	-	-	-
TOTAL	59	9	7	46	32	21	14

- * - Prélèvement de gorge
 - Liquide pleural
 - Crachats
 - Expectations

II.1.3. – Origine des souches bactériennes

Tableau XV: Origine des souches bactériennes

ORIGINES SOUCHES	HALD	IPD	HEAR	HPD
M.R.S.A.	14	-	-	-
M.S.S.A.	14	-	-	-
S. epidermidis	11	-	-	-
E. faecalis	12	-	-	4
Ps. aeruginosa	18	-	-	-
E. coli	15	-	-	6
Enterobacter	12	-	-	8
Shigella	2	-	12	-
Kl. pneumoniae	10	-	-	9
Salmonella	7	-	3	1
Proteus	19	-	-	-
H. influenzae	2	1	7	-

II.2-Matériel et réactifs

II.2.1. Pour l'identification des souches

Pour cela, nous avons utilisé les schémas habituels avec des milieux classiques (géloses ordinaires ou enrichis), des minigaleries (Hajna, mannitol - mobilité, Citrate de Simons, urée-indole) ou des galeries d'identification comme les galeries API

II.2.2. Pour la détection des bêta-lactamases

II.2.2.1. Méthode à la "céfinase"

-> Matériel:

- Lame
- eau physiologique
- pipette PASTEUR

-> Réactif:

- disque de nitrocéfine

II.2.3. Pour la recherche des plasmides

II.2.3.1. Extraction

-> Réactifs:

.Solution I

Glucose 1M
EDTA 0,1M pH8
Tris-HCL 1M pH8

.Solution II

NAOH 0,2N
SDS 1%

. Solution III

Acétate de K 5M
Acide acétique glacial

.Solution TE (pH8)

Tris HCL 1M
EDTA 0,1M
H₂O

- . Bouillon MH
- . Eau distillée stérile
- . Mélange phénol-chloroforme
- . Ethanol absolu
- . Ethanol à 70°C
- . Solution de RNase 20µg/ml de TE
- . Système de congélation à -20°C
- . Glace

-> Matériel

- . Tubes à centrifuger : "tube falcon"
- . Bain-marie, 37°C, sous agitation
- . Tubes d'eppendorf (1,5ml)
- . Centrifugeuse à haute vitesse (au moins 10.000 trs/mn)
- . Micropipettes
- . Vortex

II.2.3.2. Electrophorèse

-> Réactifs :

- Agarose ultra pure en poudre
- . Tampon de migration : solution TBE
- . Tampon de dépôt : solution bleu de bromophénol-xylène-cyanol FF - Glycérol
- . Bromure d'éthidium

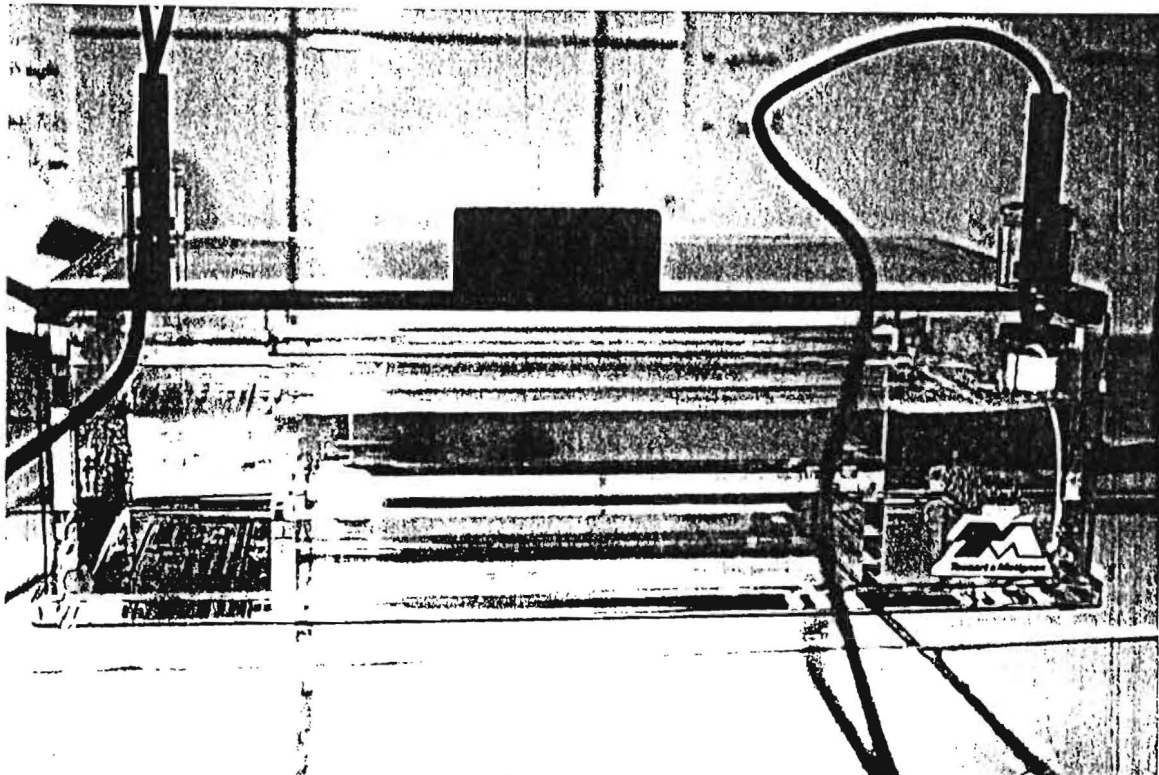
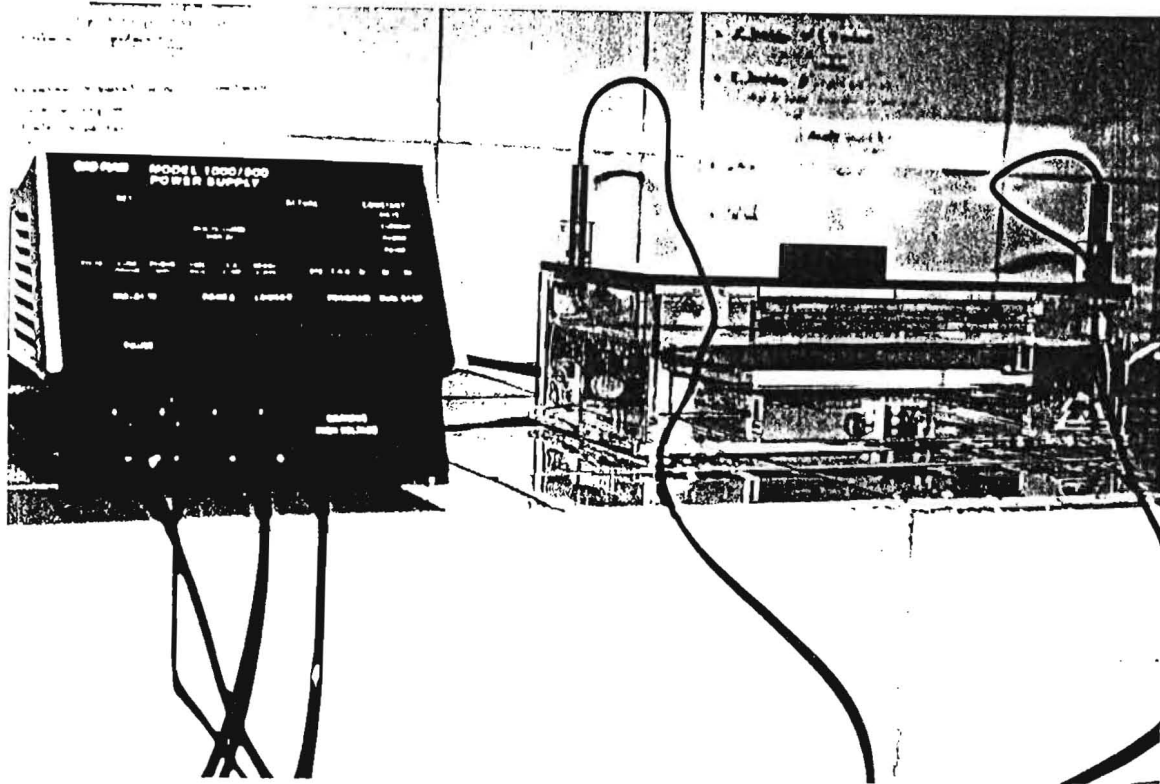
-> Matériel:

- . Erlen Meyer
- . Plateaux et cuves pour électrophorèse
- . Générateur de courant
- . Marqueur : Lamda DNA HIND III DIGEST (0,25u).

II.2.3.3 - Révélation-Détection

- . Transilluminateur UV avec une chambre noire
- . Polaroid pour photographier le gel

GENERATEUR ET BAC A ELECTROPHORESE



II.3. METHODES

II.3.1. Pour la détection des bêta-lactamases. Méthode céfinase:

II.3.1.1. Principe

C'est une méthode chromogénique.

Le principe repose sur le changement de couleur de certaines céphalosporines en solution aqueuse lorsque les liaisons B-lactam sont rompues par l'action des Bêta-lactamases.

II.3.1.2. Technique

On utilise des disques imprégnés à la nitrocéphine. Ces disques sont imbibés d'eau physiologique puis on y dispose une anse de colonies grâce à une pipette PASTEUR

II.3.1.3. Lecture

Si la souche produit une bêta-lactamase, le disque se colore en rouge.
La lecture se fera en moins de cinq minutes.

II.3.2. Recherche des plasmides

II.3.2.1. Souches testées

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| - <u>Staphylococcus aureus</u> | - Enterobacter |
| Mét-R | - <u>Staphylococcus epidermidis</u> |
| Mét-S | - <u>Escherichia coli</u> |
| - Enterocoques | - <u>Haemophilus</u> |
| - Salmonelles | - <u>Pseudomonas aeruginosa</u> |
| - Shigelles | - <u>Neisseria gonorrhoeae</u> |
| - Proteus | |

II.3.2.2. Extraction/Méthode de la lyse alcaline (77)

Ce protocole est une modification des méthodes de Birnborm et Doly (1979) et Ish-Horowicz et Burke (1981).

- Ensemencer une colonie bactérienne dans 2ml de bouillon MH (Müller-Hinton) et incubé sous agitation à +37°C pendant 24 H.

- Mettre 1,5ml de la culture dans un tube à centrifuger.

Centrifuger à 10.000 trs/mn pendant 1mn. Garder le reste de la culture à +4°C.

- Enlever le surnageant par aspiration, garder le culot bactérien aussi sec que possible

- Le culot bactérien aussi sec que possible est resuspendu dans 100 µl de la solution I glacée (+4°C), puis vortexer vigoureusement.

*** Il est important de s'assurer que le culot bactérien est complètement dissout dans la solution I.**

- Ajouter 200 µl de la solution II extemporanément préparée. Refermer le tube et mélanger son contenu en l'inversant 5 fois. Ne pas vortexer et garder le tube dans de la glace pendant 5mn.

- Au mélange précédent, ajouter 150µl de la solution III conservée à +4°C. Fermer le tube et l'agiter doucement pendant 10 secondes pour disperser la solution III dans le lysat bactérien visqueux, puis gardez-le dans de la glace pendant 3 à 5mn.

- Centrifuger à 10.000 tours/mn pendant 5mn, puis transférer le surnageant dans un nouveau tube.

- Y ajouter un égal volume de phénol-chloroforme. Mélanger en vortexant. Après centrifugation à 10.000 tours/mn pendant 2mn, transférer le surnageant dans un autre tube, tout en prenant soin d'éviter l'interface.

- Le surnageant transféré, contient le DNA double-brin qui est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu ; mélanger en vortexant et laisser au repos à la température ambiante pendant 2mn.
- Centrifuger à 10.000 tours/mn pendant 5mn.
- Enlever le surnageant par aspiration à l'aide d'une micropipette.
Renverser le tube sur un papier buvard pour un éventuel séchage.
- Le culot de DNA est rincé avec 1ml d'éthanol à 70°C gardé à + 4°C. Enlever le surnageant et laisser le tube sur la paillasse pendant 10mn afin de sécher le culot de DNA.

Enfin le DNA est dissout dans 50µl de TE contenant la RNAase A à la concentration de 20µl/ml. Mélanger rapidement et garder le DNA à - 20°C jusqu'au moment de l'analyse électrophorétique.

RESUME: En général, 1,5 ml de culture fournit 2 à 3 µg de plasmide ce qui est suffisant pour déterminer la taille de l'insertion.

Afin de relarguer l'ADN plasmidique, les parois bactériennes sont digérées à l'aide de lysosymes, puis la lyse est complétée par un traitement au SDS et au NAOH.

Le volume de NAOH ajouté à la suspension bactérienne est critique car on désire obtenir un pH 12-12,5. C'est pourquoi la lyse bactérienne est effectuée en présence de glucose qui sert de tampon. Dans ces conditions, seul l'ADN chromosomique bactérien est dénaturé, tandis que l'ADN plasmidique reste intact.

Quand le lysat est ensuite neutralisé à l'aide d'une solution d'acétate de potassium, l'ADN chromosomique forme des agrégats insolubles et les plasmides restent en solution. Simultanément, la forte concentration d'acétate de potassium provoque la précipitation de complexes protéines-SDS et des ARN de haute masse moléculaire. L'ADN plasmidique se retrouve dans le surnageant avec les ARN de transfert et ribosomaux. Ces derniers sont éliminés à l'aide de la ribonucléase A. Les ribonucléases et les protéines résiduelles sont extraites à l'aide du phénol et du chloroforme et les plasmides sont récoltés par précipitation à l'éthanol de la phase aqueuse.

L'ADN plasmidique ainsi obtenu est suffisamment pur pour être digéré par des endonucléases de restriction.

II.3.3 Electrophorèse

II.3.3.1. Principe

Il est basé sur la séparation des DNA plasmidiques et génomiques par électrophorèse sur gel d'agarose en fonction de leur poids moléculaire.

II.3.3.2. Technique (18)

C'est une électrophorèse en gel d'agarose

- . le gel utilisé est variable (0,4% à 0,7%)
- . selon la proportion utilisée mettre dans un :

- Erlen MEYER la quantité exacte de poudre d'agarose
- Ajouter du TBE (Tris-borate-EDTA) 0,5x environ 100 ml.

NB: Tenir compte de la longueur, largeur de la plaque et de l'épaisseur du gel pour obtenir un poids correct du gel et un volume correct du tampon de migration à utiliser.

* Cette solution de TBE 0,5x a été préparée à partir d'une solution stock 20x (dilution 1/40è).

- Faire bouillir sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
- ajouter 8-10µl de BET (à manipuler avec les gants, le BET est un produit mutagène) dans la solution d'agarose refroidie à 50°C
- selon la cuve, faire les points d'étanchéité avec du scotch
- couler sur la plaque.
- Laisser polymériser à la température ambiante de la salle.

- Recouvrir le gel de TBE 0,5x avec BET (50µl de BET pour 1 l de tampon : = 700 - 1000 ml/cuve)

- ôter les peignes délicatement

Dans chaque puits déposer le mélange :

2µl tampon de dépôt

18µl d'échantillon

- mettre dans un puits un marqueur de poids moléculaire, mélangé avec le tampon de dépôt (20 µl marqueur + 5 µl de tampon de dépôt)

- faire migrer à 110 volts pendant environ 3 heures (arrêter quand le 1^{er} colorant migre à 4cm).

II.3.3.3. Révélation

Mettre des gants pour sortir le gel et le regarder sur la table UV avec des lunettes. La coloration au bromure d'éthidium (BET), révélée par fluorescence fait apparaître les bandes correspondant aux DNA génomiques et plasmides. Cette révélation est faite dans une chambre noire.

La photographie est faite grâce à un polaroïd fixé au-dessus du transilluminateur

- les bandes de DNA les plus proches des puits de dépôt correspondent aux fractions chromosomiques les plus lourdes
- les fractions plasmidiques les plus légères migrent plus loin.

CHAPITRE III: RESULTATS ET COMMENTAIRES

III.1 – Les bêta-Lactamases : Profil de résistance des antibiotiques sur l'ensemble des souches testées

III.1.1. Activité des céphalosporines

Tableau XVI : Pourcentage d'activité des céphalosporines sur l'ensemble des souches testées

PROFIL CEPHALOS- PORINES	Nombre de souches testées	SENSIBILITE		INTERMEDIARE		RESISTANCE	
		N	%	N	%	N	%
Céfazoline	188	49	26.1	57	30.3	82	43.6
Céfotaxime	188	10	5.3	75	39.9	103	54.8
Ceftazidime	157	70	44.6	62	39.5	25	15.9
Ceftriaxone	188	43	22.9	70	37.2	75	39.9

Les résultats obtenus montrent que :

vis-à-vis de la céfazoline qui est une céphalosporine de 1ère génération

- 26,1% des souches testées sont sensibles,
- 30,3% présentent une sensibilité intermédiaire,
- 43,6% sont résistantes.

Tandis que les céphalosporines de 3ème génération telles que : Cefotaxime, Ceftazidime et Ceftriaxone montrent respectivement :

- une activité sur 5,3 %, 44,6 % et 22,9 % des souches
- 39,9 %, 39,5 % et 37,2% présentant une sensibilité intermédiaire
- et que 54,8 %, 15,9 % et 39,9 % des souches sont résistantes.

L'activité de la Ceftazidime est beaucoup plus grande chez les souches testées, tandis que la plus grande résistance et la sensibilité intermédiaire la plus élevée sont retrouvées avec la Céfotaxime.

En conclusion, la Cefotazidime peut-être considérée comme étant de meilleure efficacité par rapport aux autres céphalosporines.

III.1.2. Activités des pénicillines

Tableau XVII: Pourcentage d'activité des pénicillines sur l'ensemble des souches

PROFIL PENICILLINES	Nbre de souches testées	SENSIBILITE		INTERMEDIARE		RESISTANCE	
		N	%	N	%	N	%
AMPICILLINE	188	6	3.2	102	54.2	80	42.6
AMOX+AC.CLAV	188	3	1.6	60	31.9	125	66.5
AMOXICILLINE	188	48	25.5	46	24.5	94	50
OXACILLINE	65	6	9.2	20	30.8	39	60
PENI. G	65	4	6.2	34	52.3	27	41.5

De cette étude, il apparaît un taux de résistance élevé des souches testées vis-à-vis des pénicillines.

La moitié de ces souches sont résistantes à l'amoxicilline et 42,6 % à l'ampicilline.

La résistance vis-à-vis de l'amoxicilline + Acide clavulanique est de loin la plus élevée. Elle a un pourcentage 66.5 %

La résistance aux pénicillines reste de nos jours un problème majeur de thérapeutique, surtout avec les staphylocoques méticillino-résistants.

III.2-Profil de résistance des différentes espèces bactériennes aux antibiotiques

III.2.1.sur les cocci

Tableau XVIII: Activité des pénicillines et des céfalosporines sur les cocci

PROFIL ANTIBIO-TIQUES	Nbre de souches testées	SENSIBILITE		INTERMEDIAIRE		RESISTANCE	
		N	%	N	%	N	%
AMPICILLINE	65	5	7.6	30	46.1	30	46.1
AMOX+AC. CLAV.	65	3	4.6	17	26.2	45	69.2
AMOXICILLINE	65	3	4.6	40	61.1	22	33.8
OXACILLINE	65	8	12.3	18	27.7	39	60
PENI. G	65	18	27.7	20	30.8	27	41.5
CEFAZOLINE	65	8	12.3	30	46.2	27	41.5
CEFTAZIDIME	65	38	58.5	22	33.8	5	7.7
CEFOTAXIME	65	28	43.1	4	6.1	33	50.8
CEFTRIAZONE	65	32	49.2	10	15.4	23	35.4

- Les pénicillines

Presque tous les cocci présentent une résistance vis-à-vis des pénicillines

telles que : ampicilline, augmentin, oxacilline et Penicilline G avec respectivement des taux élevés de 46,1 %, 69,2 %, 60 % et 41,5 %.

L'association Amoxicilline+Ac. clavulanique est de loin la moins efficace avec un pourcentage de résistance de 69,2 % .

- Les céphalosporines

La Ceftazidime est de loin la plus active sur 58,5% des cocci, cela à partir des résultats répertoriés dans le tableau XVIII.

Mais, il n'en est pas de même pour les autres céphalosporines telles que la Ceftriaxone, Céfotaxime, et Céfazoline avec des pourcentages de résistance de 35,4%, 50,8% et 41,5%.

III.2.2 - Sur les bacilles à Gram négatif

III.2.2.1 - Entérobactéries

Tableau XIX : Activité des pénicillines et des céphalosporines sur les entérobactéries

ANTIBIO- TIQUES	PROFIL Nbre de souches testées	SENSIBILITE		INTERMEDIAIRE		RESISTANCE	
		N	%	N	%	N	%
AMPICILLINE	103	15	14.5	32	31.1	56	54.4
AMOX. + AC. CLAV.	103	10	9.7	24	23.3	69	67
AMOXICILLINE	103	16	15.1	27	26.2	60	58.8
CEFAZOLINE	103	4	3.9	60	58.2	39	37.9
CEFTAZIDIME	103	22	21.4	62	60.2	19	18.4
CEFOTAXIME	103	11	10.7	28	27.2	64	62.1
CEFTRIAZONE	103	5	4.8	49	47.6	49	47.6

- les pénicillines:

les entérobactéries sont toutes résistantes aux pénicillines plus précisément à l'ampicilline, l'association Amox.+Ac. clav. et l'amoxicilline avec des pourcentages respectifs de 54,4%, 67% et 58,8 % .

- les céphalosporines

Les entérobactéries présentent un fort taux de sensibilité intermédiaire avec les céphalosporines.

Les taux prédominants sont de 60,2%, 47,6% et 58,2% avec Cefotaxime, Ceftriaxone et Céfazoline.

Par contre 62,1% des entérobactéries sont résistantes à la Céfotaxime. Cette grande résistance fera l'objet de la recherche de la multirésistance chez ces dernières.

III.2.2.2 - *Ps. aeruginosa*

Tableau XX: Résistance de *Ps. aeruginosa* vis-à-vis des pénicillines et des céphalosporines

PROFIL ANTIBIO- TIQUES	Nbre de souches testées	SENSIBILITE		INTERMEDIAIRE		RESISTANCE	
		N	%	N	%	N	%
AMPICILLINE	18	3	16.7	2	11.1	13	72.2
AMOX + Ac. CLAV.	18	2	11.1	1	5.6	15	83.3
AMOXICILLINE	18	3	16.7	3	16.7	12	66.6
CEFAZOLINE	18	2	11.1	4	22.2	12	66.7
CEFTAZIDIME	18	16	88.9	1	5.5	1	5.5
CEFOTAXIME	18	8	44.5	4	22.2	6	33.3
CEFTRIAZONE	18	10	55.5	5	27.8	3	16.7

- les pénicillines

Vis-à-vis des ces pénicillines : ampicilline, l'association Amox.+Ac. clav. et amoxicilline, toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont résistantes.

Ce pourcentage de résistance est de 72,2% avec l'ampicilline, 83,3% avec l'association Amox+Ac. clav. et 66,6% avec l'amoxicilline.

- les céphalosporines

Les souches de *Ps. aeruginosa* se sont révélées fortement résistantes à la céfazoline avec un taux de 66,7%.

Les autres céphalosporines sont actives sur la plupart des souches.

Les taux de sensibilité des *Ps.aeruginosa* sont de 88,9% avec la Ceftazidime, 55,5% avec la Ceftriaxone et 44,4% avec la Céfotaxime.

III.3. Fréquence de détection de la secrétion de bêta-lactamases chez les entérobactéries et *Ps. aeruginosa*

**Tableau XXI : Bêta-lactamases chez les
bacilles à Gram négatif**

Souches	Nbre total	Cefinase +	
		N	%
<i>E. coli</i>	21	21	100%
<i>Enterobacter</i>	20	20	100%
<i>Kl.pneumoniae</i>	19	19	100%
<i>Proteus</i>	19	19	100%
<i>Ps. aeruginosa</i>	18	18	100%
<i>Salmonella</i>	11	4	36.4%
<i>Shigella</i>	14	14	100%
<i>H. influenzae</i>	10	0	0%

Toutes les souches sont sécrétrices de bêta-lactamases à 100 % sauf *Salmonella* avec un pourcentage de 36 %, alors que les souches d'*Haemophilus influenzae* sont non sécrétrices.

III.4. Multirésistance

Tableau XXII: Relation Béta-Lactamase et multirésistance chez les cocci

PROFIL Souches bactériennes	Souches multirésistantes		Souches béta-lactamase +	
	N	%	N	%
M.R.S.A. N=14	10	71.4%	14	100%
M.S.S.A. N=14	8	57.1	13	92.8%
S. epiderm. N=11	10	90.9	11	100%
E. faecalis N=16	14	87.5	8	50%

Tableau XXIII: Nombre de cocci multirésistants en fonction du nombre d'antibiotiques

PROFIL ESPECES	Nb	2ATB	3ATB	4ATB	5ATB	6ATB	7ATB	8ATB
MRSA	14	2	1	1	4	2	-	-
MSSA	14	-	-	1	1	4	2	-
S.epiderm.	11	-	-	1	2	-	4	4
E.faecalis	16	3	1	2	4	3	1	-

Les résultats de la multirésistance sont répertoriés dans les tableaux XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI .

Parmi les souches testées certaines ont manifesté une résistance vis-à-vis de deux antibiotiques au moins, elles font ensuite l'objet de la recherche de béta-lactamase dont la sécrétion est le principal mécanisme de la résistance bactérienne.

**Tableau XXIV: Relation Béta-Lactamase
et multirésistance chez
les bacilles**

PROFIL Souches bactériennes	Souches multirésistantes		Souches béta-lactamase +	
	N	%	N	%
Sh. flexneri N=8	10	71.4%	14	100%
Sh. dysenteriae N=3	8	57.1	13	92.8%
Sh. sonnei N=3	10	90.9	11	100%
E. cloacae N=14	8	57.1	14	100
E. agglomomerans N=5	2	40	5	100
E. gergoviae N=1	1	100	1	100
Ps. aeruginosa N=18	17	94.4	18	100
Kl. pneumoniae N=19	12	63.1	19	100
Sal. typhi N=9	9	100	3	33.3
Sal. enteritidis N=1	1	100	1	100
Sal. spp N=2	1	50	1	50
E. coli N=21	10	47.6	21	100
P. mirabilis N=14	11	78.5	14	100
P. vulgaris N=4	1	25	4	100
P. penneri N=1	1	100	1	100
H. influenzae N=10	1	10	0	0

**Tableau XXV: Nombre de bacilles
multirésistants en fonction du
nombre d'antibiotiques**

ESPECES	Nb	2ATB	3ATB	4ATB	5ATB	6ATB	7ATB
Sh. flexneri	8	-	1	1	5	1	-
Sh. dysenteria	3	-	3	-	-	-	-
Sh. sonnei	3	-	1	-	1	-	-
E. cloacae	14	3	3	1	-	-	-
E. agglomerans	5	1	1	-	-	-	-
E. gergoviae	1	-	-	1	-	-	-
Ps. aeruginosa	18	4	2	8	2	1	-
Kl. pneumoniae	19	1	-	1	1	4	2
Sal. typhi	9	-	-	2	3	4	-
Sal. enteritidis	1	-	1	-	-	-	-
Sal. spp	2	-	-	1	-	-	-
E. coli	21	2	-	1	1	2	1
P. mirabilis	14	1	4	2	2	2	1
P. vulgaris	4	-	-	-	-	1	-
P. penneri	1	-	1	-	-	-	-
H. influenzae	10	-	-	-	-	1	-

**Tableau XXVI. Fréquence d'apparition
des différents antibiotiques
dans la multirésistance**

ANTIBIOTIQUES	FREQUENCE D'APPARITION
AMPICILLINE	14
AMOX + AC.CLAV.	16
AMOXICILLINE	14
CEFTAZIDINE	8
CETRIAXONE	13
CEFOTAXIME	16
CEFAZOLINE	13
OXACILLINE	4
PENICILLINE G	4

Cette multirésistance concerne cent trente (130) souches soit 69,1% de l'ensemble des différentes espèces.

Ps. aeruginosa et *S. epidermidis* sont les plus multirésistants, car leur multirésistance concerne au minimum 2 et 4 antibiotiques et aux maximum 6 et 8 antibiotiques.

Les antibiotiques les plus concernés sont la Céfotaxime, et l'association amoxicilline-Acide clavulanique puis l'ampicilline, l'amoxicilline, la Ceftriaxone et la Céfazoline et à un degré moindre la Ceftazidime.

Si pour certaines souches cette multirésistance ne concerne que deux antibiotiques, pour d'autres, elle peut aller jusqu'à 8 (tableau XXVI).

Enfin, si nous considérons les différents groupes retenus, nous nous rendons compte que cette multirésistance concerne :

- 69,2% de l'ensemble des souches
- 22,9% des cocci
- 46,3% des bacilles à Gram négatif

III.5-La sécrétion de bêta-lactamases

La sécrétion de bêtalactamases est le principal mécanisme de la résistance bactérienne. Mais la sécrétion de cette enzyme par une bactérie n'est pas formellement équivalente à une résistance. Ainsi, nous avons recherché la présence de cette enzyme sur toutes les souches afin d'édifier sa responsabilité dans la résistance (tableau XXVII). Les résultats du test montrent que 161 souches soit 85.64 % de l'ensemble, sécrètent une bêta-lactamase. Et, si nous considérons les différents groupes, la sécrétion de cette enzyme concerne :

55 cocci soit 29,3% et 114 bacilles soit 60,6%

Tableau XXVII :Pourcentage de positivité en bêta-Lactamases chez l'ensemble des souches

PROFIL SOUCHES	NOMBRE	CEFINASE (+) Nbre	%
MRSA	14	14	100
MSSA	14	13	92.8
S. epidermidis	11	11	100
E. faecalis	16	8	50
H. influenzae	10	0	0
Sh. flexneri	8	8	100
Sh. dysenteriae	3	3	100
Sh. sonnei	3	3	100
E. cloacae	14	14	100
E. agglomerans	5	5	100
E. gergoviae	1	1	100
Ps. aeruginosa	18	18	100
Kl. pneumoniae	19	19	100
Sal. typhi	9	3	33.3
Sal. enteritidis	1	0	0
Sal. spp	2	1	50
E. coli	21	21	100
P. mirabilis	14	14	100
P. vulgaris	4	4	100
P. penneri	1	1	100
TOTAL	188	161	85.64

Un taux de sécrétion élevé a été observé avec les Staphylocoques, les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

A l'exception de *Salmonella enteritidis* où le taux de sécrétion est faible.

Par contre les souches d'*H. influenzae* étudiées sont non sécrétrices de bêta-lactamases par le test à la céfinase.

III.6 – Résultats globaux de l'électrophorèse du DNA plasmidique

L'électrophèse sur gel d'agarose nous a permis de confirmer la présence de plasmides chez les souches testées.

Cette technique consiste en la séparation des plasmides en fonction de leur taille, de leur poids moléculaire, cela en présence d'un marqueur de taille témoin.

Les résultats obtenus, sont répertoriés dans les tableaux suivants :

Tableau XXVIII: Pourcentage du nombre de cocci possédant un DNA plasmidique

COCCI	DNA PLASMIDIQUE (+)	
	N	%
M.R.S.A.	0	0
M.S.S.A.	1	7.14
S. epidermidis	2	18.18
E.faecalis	5	31.25
Total	8	23.93

Notre étude porte sur un effectif total de 188 souches bactériennes testées. Le nombre de DNA plasmides détectés par électrophorèse sur gel d'agarose y est de 54 soit un pourcentage de 28,72 %.

Le taux de détection des DNA plasmidiques est beaucoup plus important chez les bacilles que chez les cocci avec des nombres de 47 et 8 DNA et des pourcentages respectifs de 23,93 % et 4, 79 %.

Tableau XXIX : Pourcentage de bacilles possédant un DNA plasmidique

BACILLES	DNA PLASMIDIQUE +	
	N	%
Sh. flexneri N = 8	6	75
Sh.dysenteriae N = 3	2	66.67
Sh. sonnei N = 3	3	100
E. cloacae N = 14	5	35.71
E.agglomerans N = 5	3	60
E. gergoviae N = 1	0	0
Ps.aeruginosa N = 18	2	11.11
Kl. pneumoniae N = 19	4	21.05
Sal. typhi N = 9	3	33.33
Sal.enteritidis N = 1	1	100
Sal. spp N = 2	0	0
E. coli N = 21	5	23.81
P. mirabilis N = 14	10	71.43
P. vulgaris N = 4	1	25
P. penneri N = 1	1	0
H.influenzae N = 1	1	10
Total	47	4.79

Tableau XXXI: Répartition et pourcentage du nombre de souches résistantes vis-à-vis des pénicillines et des céphalosporines, possédant un DNA plasmidique.

SOUCHES RESISTANTES	DNA PLASMIDIQUE +	POURCENTAGE %
AMPICILLINE N=71	18	25.35
AMOXICILLINE N = 80	24	30
AMOX+AC. CLAV. N = 103	29	28.16
PENICILLINE N = 28	5	17.86
CEFAZOLINE N = 70	22	31.43
CEFTAXIDIME N = 25	13	52
CEFTRIAXONE N = 62	22	50
CEFOTAXIME N = 169	28	39.44

Les résultats répertoriés dans les tableaux ci-dessus montrent que parmi les 282 souches présentant une résistance vis-à-vis à l'ampicilline, l'amoxicilline, l'augmentin et la pénicilline, seules les 76 présentent à la fois une résistance et possèdent un DNA plasmidique, à savoir :

- sur 71 souches résistantes à l'ampicilline, 18 sont à la fois résistantes et possèdent un DNA plasmidique, soit 25,35 %.

- 24 sont résistantes à l'Amoxicilline et ont un DNA soit 30 %.
- 29 à l'association Amoxicilline+Acide clavulanique-R avec un DNA soit 28,16%.
- 5 Peni - R avec un DNA plasmidique soit 17,86 %.

Par contre, les céphalosporines sont inefficaces sur 256 souches et 85 de ces dernières présentent les mêmes aspects que les précédentes testées avec les pénicilline. (Tableau XXXI)

Le nombre de souches résistantes aux céphalosporines et possédant 1 DNA sont:

- céfazoline : 22 soit 31,43 %
- ceftazidime: 13 Soit 52 %
- ceftriaxone: 22 soit 55 %
- céfotaxime : 28 soit 39,44 %.

Tableau XXXII: Pourcentage de bêta-lactamase(+) et DNA plasmidique (+) rapportés aux céphalosporines chez les bacilles à Gram négatif

PROFIL Céphalosporine	SENSIBILITE		INTERMEDIAIRE		RESISTANCE	
	N	%	N	%	N	%
CEFAZOLINE N = 24	3	12.5	1	4.2	20	83.3
CEFTAZIDIME N = 18	5	27.8	1	5.6	12	66.7
CEFTRIAZONE = 38	17	44.7	1	2.6	20	52.6
CEFOTAXIME N = 33	8	24.2	0	0	25	75.7

N = Nombre de souches testées avec la céfazoline sécrétant une bêta-lactamase et possédant un DNA plasmidique.

Nous retenons de ce tableau que parmi les souches testées par les céphalosporines, ceux sécrétant une bêta-lactamase et possédant un DNA plasmidique sont résistants dans la grande majorité.

Le nombre, le pourcentage de souches sécrétrices de bêta-lactamases possédant un DNA plasmidique à l'électrophorèse et résistantes aux céphalosporines sont:

- 20 pour la céfazoline soit 83.3 % des souches
- 12 pour la ceftaxidime soit 66.7 % des souches
- 20 pour la ceftriaxone soit 52.6 % des souches
- 25 pour la cefotaxime soit 75.7 % des souches

La majeure partie des souches résistantes aux céphalosporines sécrètent une bêta-lactamase et possèdent en même temps un DNA plasmidique.

Tableau XXXIII: Pourcentage de bêta-lactamases (+) et de DNA plasmidique par rapport aux pénicillines chez les cocci

PROFIL	SENSIBILITE		INTERMEDIAIRE		RESISTANCE	
Pénicillines	N	%	N	%	N	%
AMPICILLINE N = 33	16	48.5	1	3	16	48.5
AMOXICILLINE N = 29	7	24.1	0	0	22	75.9
AMOX+AC. CLAV. N = 40	10	25	2	5	28	70
PENICILLINE N = 3	0	0	0	0	3	100

Le nombre de germes résistants aux pénicillines, sécrétant une bêta-lactamase et possédant un DNA plasmidique est 69 soit un pourcentage 15.26. Selon chaque antibiotique ce nombre est de:

- 16 pour l'ampicilline soit 48.5 % des souches
- 22 pour l'amoxicilline soit 75.9 % des souches.
- 28 pour l'association amoxicilline + acide clavulanique soit 70 % des souches
- 3 pour la pénicilline soit 100 % des souches.

Plus de la moitié des souches sélectionnées ont le profil de résistance aux bêta-lactamines (Amoxicilline, Association amoxicilline + Acide clavulanique, et Pénicilline G), sont sécrétrices de bêta-lactamases et possèdent un DNA plasmidique.

TABLEAU XXXIV: Fréquence d'apparition des différents fragments plasmidiques chez certaines souches.

DIFFERENTS FRAGMENTS PLASMIDIQUES (Taille en MD)	APPARITION (Nombre de fois)
3,64	7
1,55	7
6,28	6
2,23	6
1,35	5
4,37	4
0,38	4
0,31	4

La taille de ces différents fragments obtenus a été définie à partir de celles du marqueur.

III.6 - PROFILS PLASMIDIQUES

Les profils plasmidiques sont obtenus à partir de l'électrophèse sur gel d'agarose à 0,5 % des plasmides des différentes souches testées.

Le commentaire des profils plasmidiques reposera sur les résultats obtenus à partir des photos du gel.

Le nombre de fragments par DNA plasmidique est variable selon les différentes espèces bactériennes.

Ce nombre est quelquefois:

* élevé avec certaines espèces. C'est le cas de *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter. cloacae*, *Escherichia. coli*.

Ces espèces bactériennes présentent respectivement chacune un nombre de DNA plasmidique égal à 6, 3, 5 et 5 avec un total de fragments du DNA pour chaque espèce:

- *Sh. flexneri*, 6 DNA, 20 fragments
- *Sh. sonnei*, 3 DNA, 12 fragments
- *E. cloacae*, 5 DNA, 14 fragments
- *E. coli*, 5 DNA, 15 fragments.

* moyen pour certaines souches telles que :

- *S. epidermidis*, 2 DNA, 2 fragments
- *P. mirabilis*, 10 DNA, 10 fragments
- *E. faecalis*, 5 DNA, 5 fragments
- *H. influenzae*, 1 DNA, 1 fragment

* faible pour d'autres comme :

- *Sh. dysenteriae*, 2 DNA, 5 fragments
- MSSA, 1 DNA, 3 fragments
- *Ps. aeruginosa*, 2 DNA, 4 fragments
- *K. pneumoniae*, 2 DNA, 4 fragments
- *S. enteritidis*, 1 DNA, 6 fragments
- *S. typhi*, 3 DNA, et 8 fragments
- *P. vulgaris*, 1 DNA, et 2 fragments

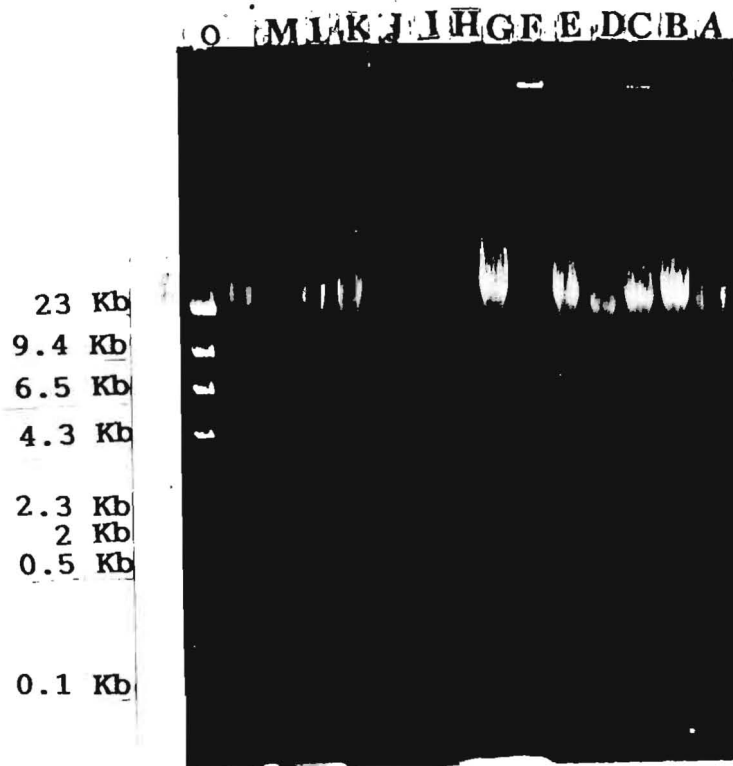


FIGURE 1: Représentation des profils plasmidiques des souches de Shigella et d'Escherichia coli

Légende:

A: <u>Shigella flexneri</u>	H: <u>Escherichia coli</u>
B: <u>Shigella sonnei</u>	J: <u>Escherichia coli</u>
C: <u>Shigella flexneri</u>	I: <u>Escherichia coli</u>
D: <u>Shigella dysenteria</u>	K: <u>Escherichia coli</u>
E: <u>Shigella sonnei</u>	L: <u>Escherichia coli</u>
F: <u>Shigella flexneri</u>	M: <u>Escherichia coli</u>
G: <u>Shigella flexneri</u>	N: <u>Escherichia coli</u>
O: Marqueur de taille (Lamda Hind III Digest)	

Nous notons la présence de plasmides chez 7 souches sur les 14 testées (souches A, B, C, D, E, G, K). Les souches F, H, I, J, L, M, N n'ont pas de plasmides

Nous remarquons le même profil chez les souches C et G alors que chez les souches B et E seulement 4 bandes sont identiques avec des tailles variant de 0.5 à 2.1 Kb.

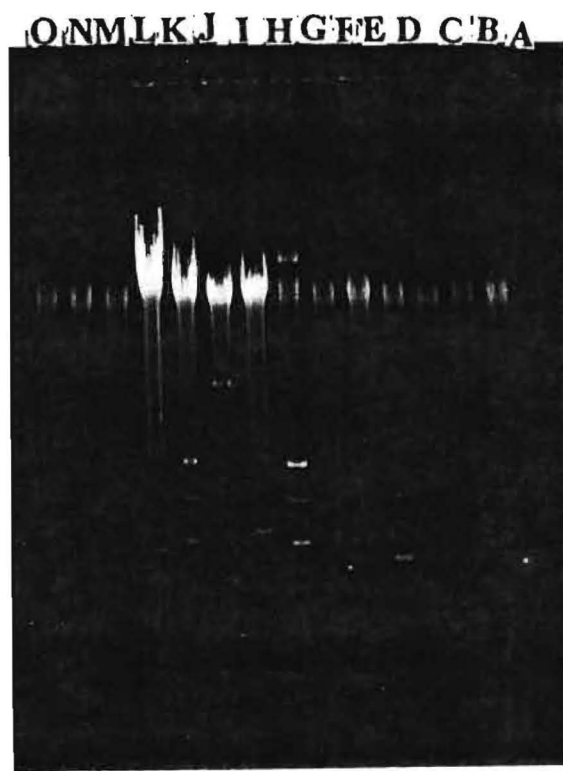


FIGURE 2: Profil plasmidique de quelques souches d'entérobactéries

Légende:

A: <u>Salmonella typhi</u>	H: <u>Shigella flexneri</u>
B: <u>Salmonella spp</u>	J: <u>Shigella dysenteriae</u>
C: <u>Salmonella spp</u>	I: <u>Shigella flexneri</u>
D: <u>Salmonella enteritidis</u>	K: <u>Salmonella spp</u>
E: <u>Salmonella spp</u>	L: <u>Shigella flexneri</u>
F: <u>Salmonella spp</u>	M: <u>Klebsiella pneumoniae</u>
G: <u>Salmonella spp</u>	N: <u>Klebsiella pneumoniae</u>
	O: <u>Klebsiella pneumoniae</u>

Absence de plasmides chez les souches A, B, C, D, F, G, M, N et O. Les souches H et K ont un profil identique. Les souches E, H, K et L ont des bandes identiques 2 à 2.

Les souches B, E, H et J ont chacune un plasmide identique de 3.3 Kb. Les souches B, E, L ont également un plasmide identique commun de 5.5 Kb. Enfin 2 souches ont en commun un plasmide de 6.9 Kb: il s'agit des souches H et J.

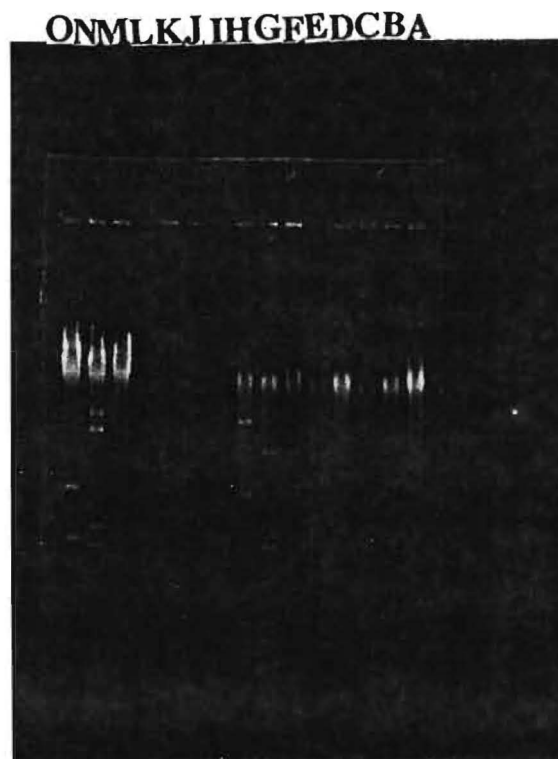


FIGURE 3: Profil plasmidique de Proteus, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterobacter cloacae

Légende:

A: Proteus mirabilis
 B: Proteus mirabilis
 C: Proteus mirabilis
 D: Proteus mirabilis
 E: Escherichia coli
 F: Escherichia coli
 G: Escherichia coli

H: Enterococcus faecalis
 J: Enterococcus faecalis
 I: Enterococcus faecalis
 K: Enterococcus faecalis
 L: Enterococcus faecalis
 M: Enterobacter cloacae
 N: Enterobacter cloacae
 O: Enterobacter cloacae

Les souches F, G et H possèdent chacune 2 plasmides identiques de 3.3 Kb. Les souches N et O ont en commun chacune un plasmide identique de 2 Kb. Les souches A, B, D, E, I, J, K, L n'ont pas de plasmides.

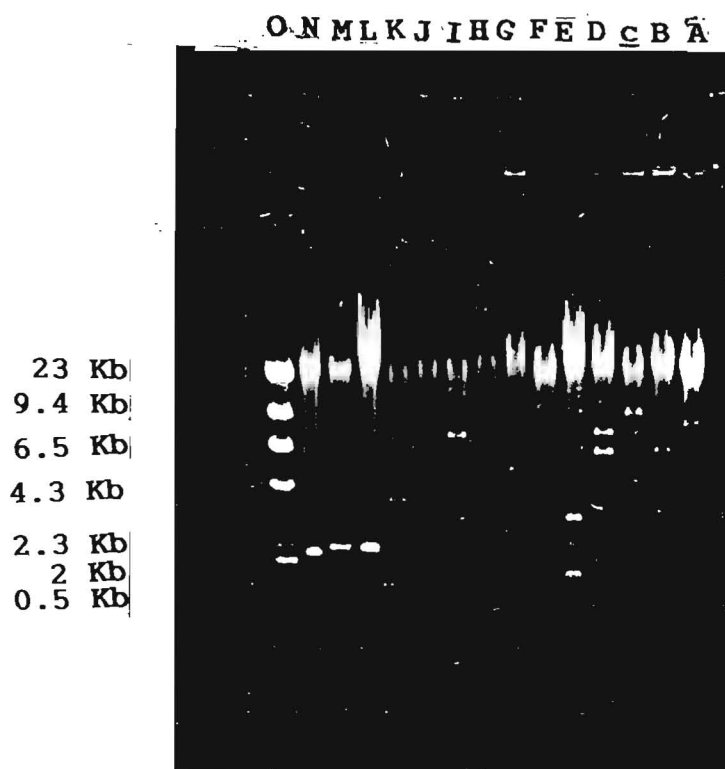


FIGURE 4: Profil plasmidique de quelques cocci et bacilles

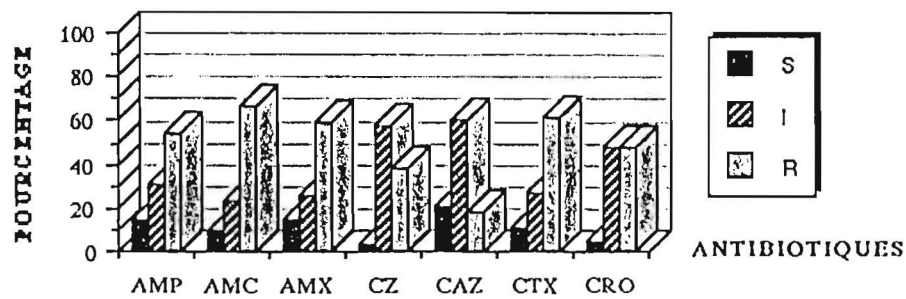
Légende:

A: <u>Staphylococcus aureus Methi-S</u>	H: <u>Escherichia coli</u>
B: <u>Staphylococcus aureus Methi-R</u>	I: <u>Escherichia coli</u>
C: <u>Staphylococcus epidermidis</u>	J: <u>Enterobacter cloacae</u>
D: <u>Enterobacter agglomerans</u>	K: <u>Enterobacter cloacae</u>
E: <u>Enterobacter agglomerans</u>	L: <u>Pseudomonas aeruginosa</u>
F: <u>Klebsiella pneumoniae</u>	M: <u>Pseudomonas aeruginosa</u>
G: <u>Klebsiella pneumoniae</u>	N: <u>Proteus vulgaris</u>
O: Marqueur de taille	

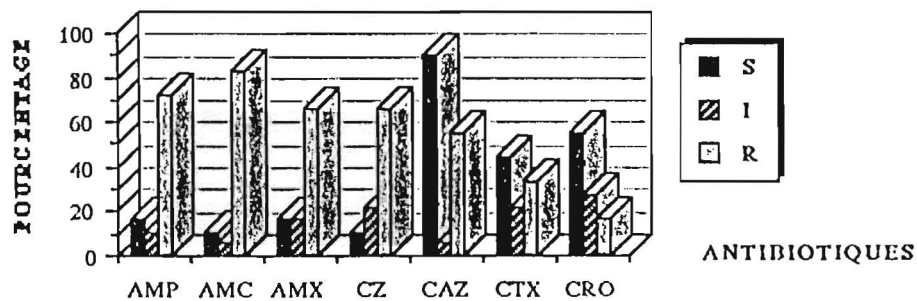
Toutes les souches possèdent au moins un plasmide.

Les souches D et I ont également un plasmide identique de 3.3 Kb

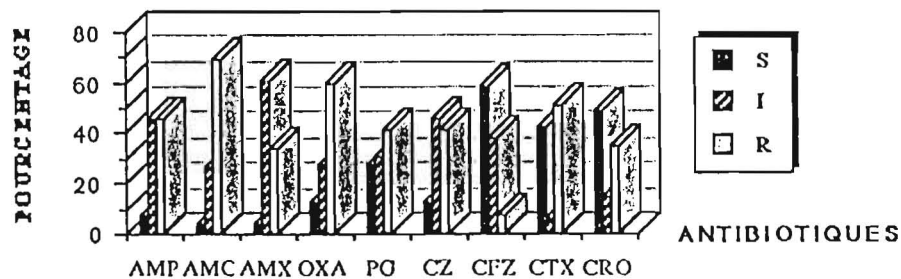
ANNEXE



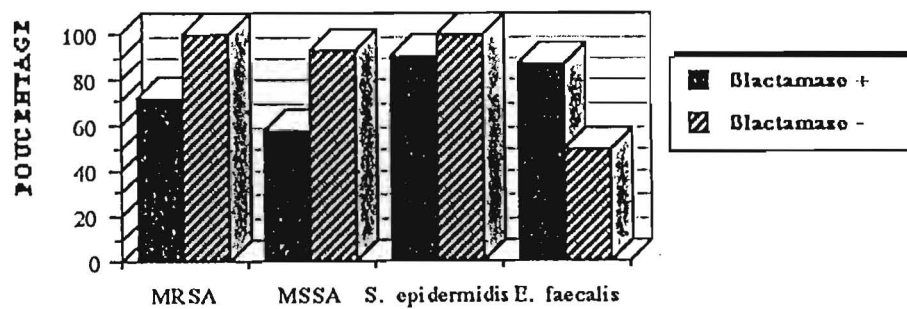
GRAPHIQUE N°2: Activité des pénicillines et des céfalosporines sur les entérobactéries



GRAPHIQUE N°3 : Résistance de *Ps. aeruginosa* vis à vis des pénicillines et des céfalosporines



GRAPHIQUE N°1: Activité des pénicillines et des céfalosporines sur les cocci



GRAPHIQUE N° 4: Relation B-lactamase et multirésistance chez les cocci

CHAPITRE IV : DISCUSSION

La discussion portera sur la caractérisation des plasmides de résistance aux Béta-lactamines. Pour cela, elle s'articulera autour de 3 axes à savoir :

- > Fréquence de détection des plasmides
- > Corrélation plasmides de résistance et sécrétion de Béta-lactamases
- > Corrélation plasmides - Béta-lactamases et Phénotype de résistance.

IV.1 – Fréquence de détection des plasmides

Sur l'ensemble des souches testées, nous avons constaté parmi les 188 différentes espèces bactériennes, un nombre de plasmides égal à 54 soit un pourcentage de 28,72 %.

DIALLO (33) avait trouvé que sur 167 souches seules 17 possédées un plasmide.

Notre étude nous montre que la détection des plasmides est beaucoup plus fréquente chez les bacilles Gram-négatif que les cocci.

Elle est de 13,85 % chez les cocci et de 36,59 % chez les bacilles.

IV.1.1 – Les cocci

L'étude a porté sur 55 cocci.

Parmi ces 55 souches, seules 8 avaient permis la mise en évidence de plasmides. La fréquence de détection est plus élevée chez les *Enterococcus faecalis* que chez les staphylocoques.

Cette fréquence est de :

- 5 (5 souches sur 16) soit un pourcentage de 9.1 % chez *E. faecalis*.
- 2 (2 souches sur 11) soit un pourcentage de 3.64 % chez *Staphylococcus epidermidis*.
- 1 (1 souche sur 14) soit un pourcentage de 1,95 % chez *Staphylococcus aureus* méti-S
- 0 chez *S. aureus* méti-R.

- Les entérocoques de notre étude montrent le même profil plasmidique. Ils ont le même plasmide de taille égale à 9,4 Kb.

Par contre, CHIRURGI VA. (27) dans son étude, a trouvé 9 plasmides sur 23 souches d'origine urinaire et rectale, soit 39,13 %.

RICE LB. (73) a démontré la présence de 4 plasmides chez 4 souches multirésistantes de *Enterococcus faecalis*. La taille de ces plasmides varie de 0 à 3 Kb, soit 100 %.

Alors que DIALLO O.K (33) a trouvé une fréquence de détection de plasmide de 6 Plasmides sur 14 souches, soit 42,86 %.

Le faible taux de plasmide détecté peut avoir diverses origines.

Chez les staphylocoques, la fréquence de détection des plasmides est variable d'une espèce à l'autre.

- Avec *S. epidermidis*, la fréquence est de 2 plasmides sur 11 souches, soit un pourcentage de 18,18 %. Les résultats du profil électrophorétique montrent que ces plasmides sont de taille égale à 6,5 Kb et 9,4 Kb.

TOBITA M.(88) a détecté par électrophorèse sur gel d'agarose, 8 plasmides sur 12 souches de *S. epidermidis* de profil antibiotique différent, soit un pourcentage de 66,67 %.

Ces 8 souches montrent chacune un plasmide de 1,9 Kb et d'autres fragments non encore identifiés.

- Chez *S. aureus* méti-s la fréquence de détection est de 1 plasmide parmi 14 souches, soit un pourcentage de 7,14 %. Ce plasmide est de 2,3 Kb.

NOVICK R.P.(61), par ses travaux, a permis de mettre en évidence des plasmides dans les souches de staphylocoques. Ces plasmides sont répartis en trois grands groupes :

- * petits plasmides dont la taille varie entre 2,5 et 5 Kb avec des nombres de copies de 10 à 50.
- * gros plasmides de taille égale à 25 à 35 Kb avec 5 copies par cellule.
- * plus larges plasmides dont la taille varie entre 40-60 Kb. Ces plasmides de ces types conjugatifs.

Il en est de même avec COIA J.E. (30) qui a détecté des plasmides de 14-51 Kb ou 2.9-5.8 Kb chez les *S. aureus* méti-R et un plasmide de 2.6 Kb chez *S. aureus* méti-S.

Il a constaté, ce même plasmide chez *S. aureus* méti-R.

Le plasmide de 2.3 Kb obtenu, a été rencontré lors des travaux de MELO CRITINO J.A.G. (54) (= 2,39 Kb) et ce plasmide code pour la résistance à l'érythromycine.

- Par contre, nous n'avons pas constaté de plasmides chez les souches de *S. aureus* Méti-R.

En somme, l'absence de plasmides et les faibles fréquences de détection observées peuvent avoir des origines diverses.

Il peut s'agir de :

- * perte de plasmides lors de repiquages

La plupart des souches testées a été une suite de travail de l'année dernière

- * d'une faible affinité des protéines de liaison à la pénicilline PBP 5

ET PBP 5' ROBERTA F.(76)

- * la détection non immédiate des échantillons conservés à - 20° C. Cette longue conservation pouvant conduire à la dénaturation du DNA plasmidique.

- * perte du DNA plasmidique au cours de l'extraction

- * d'un mécanisme de résistance basé sur une bêta-lactamase plasmidique d'origine staphylococcique.

Ce mécanisme s'observe chez les entérocoques qui présentent un faible taux par rapport aux autres études.

RICE LB. a mis en évidence l'incorporation d'un gène de bêta-lactamase chromosomique CH 19 des souches de staphylocoques, chez *E. faecalis*, à partir d'un transposon.

L'hypothèse d'un plasmide transféré par conjugaison dans le chromosome des souches d'*E. faecalis* a été émise par PEPPER (69) en 1987.

Ce mécanisme de transfert peut être également dû à un transposon.

Les plasmides porteurs de la bêta-lactamase sont différents chez les staphylocoques et les entérocoques. Un élément se rapprochant du transposon Tn 4201, associé aux bêta-lactamases de staphylocoques, a été trouvé sur certains plasmides d'entérocoques à proximité de la bêta-lactamase (39).

. Cette absence de plasmides ou le faible nombre observé chez les staphylocoques peut s'expliquer par le fait que comme chez les bactéries à Gram négatif, beaucoup de gènes de résistance aux antibiotiques des staphylocoques sont portés par des transposons (61) et par conséquent, peuvent exister soit sur des plasmides, soit intégrer dans le chromosome.

. Le nombre de plasmides détectés chez les staphylocoques par DIALLO (33) est supérieur à celui de notre travail.

Ceci peut être dû au fait que la méthode présente quelques imperfections, ou bien par le fait que les autres ont amélioré la méthode par l'utilisation de la lysostaphine et le lysozyme qui complètent la lyse de la paroi bactérienne ou servent la sélection des souches.

La recherche de plasmides effectuée par DIALLO (33) sur les cocci, a révélé une fréquence de détection de 10.19 % des plasmides. C'est-à-dire sur 167 cocci, 17 ont présenté un plasmide à l'électrophorèse.

De notre étude, il ressort une fréquence comparable de détection des plasmides chez les cocci qui est de 13, 85 %.

IV.1.2. – Les bacilles à Gram négatif

L'étude des bacilles a porté sur 123 souches.

Seules 45 souches ont permis la mise en évidence de plasmides, soit 36,59 %.

La fréquence de détection de plasmide est plus élevée chez les shigelles puis les Proteus, ensuite les Enterobacter et Salmonelles et enfin viennent les Klebsielles et les Pseudomonas avec un nombre égal à 2.

Cette fréquence est de :

- 11 (11 souches sur 14) soit 8.94 %, plus précisément :

--> 6 plasmides avec *S. flexneri* soit 4,88 %

--> 2 plasmides avec *S. dysenteriae* soit 1,63 %

--> 3 plasmides avec *S. sonnei* soit 2,44 %

En général, ces plasmides des différentes espèces présentent presque le même profil électrophorétique. Elles possèdent des plasmides de : 2 ; 2,1 ; 2,2 ; 2,3 ; 3,1 ; 4,3 ; 6 ; 7,9 et 9 Kb.

Par rapport à CASALINO M. (19), les plasmides qu'il a caractérisé renferment des tailles de : 1,6 ; 1,9 ; 2,7 ; 3,2 ; 4,1 et 6,3 Kb.

Ces souches de shigelles sont des shigelles endémiques. Ces poids moléculaires sont proches de nos résultats.

Nous constatons le même plasmide de taille 3.2 Kb dans les études et également chez les différentes souches de shigelles : *Shigella flexneri*, *dysenteriae* et *sonnei*.

Ce même plasmide de 3.2 Kb code pour la résistance aux bêta-lactamines et les autres peuvent coder pour d'autres antibiotiques. Ils peuvent également présenter ces plasmides comme des plasmides de virulence.

- 11 (11 souches présentent un plasmide sur 19) soit 8,94% :

--> 10 plasmides avec *P.mirabilis* soit 8,13 %

--> 1 plasmide avec *P.vulgaris* soit 0,81 %

--> Pas de plasmide chez *P.penneri*.

Les profils plasmidiques de ces 19 souches ont mis en évidence des plasmides de taille supérieure à 23 Kb. Ces plasmides sont de très grosse taille. Cette taille correspond au fragment le plus lourd de mon marqueur.

Alors qu'avec *P.vulgaris*, nous avons constaté que la souche hébergeait un plasmide de 2,3 Kb.

Ces plasmides ne codent pas pour la résistance aux bêta-lactamines.

En général, la résistance aux bêta-lactamines est d'origine chromosomique.

- La fréquence de détection de plasmide chez les Enterobacter est de 8 souches sur 20, soit 6,5 %. Selon les différentes espèces, cette fréquence est de:

--> 4.1% chez *E.cloacae*

--> 2.4 % chez *E. agglomerans*

Ces plasmides présentent différentes tailles selon leur profil électrophorétique. Elles sont de : 2,1 ; 2,2 ; 3,3 ; 4,2 ; 5,3 ; 6,5 et 7, 9 Kb.

GRATTARD F. (38) a montré des plasmides de taille de 1,3 ; 2,2 ; 5, 3 et 9,6 Kb chez les Enterobacter. Ces valeurs sont proches des nôtres.

Nous avons constaté des deux travaux, deux plasmides de même taille. Ce sont les plasmides 2,2 Kb et 5,3 Kb.

Ces plasmides codent pour la résistance aux bêta-lactamines et également aux autres antibiotiques.

- la fréquence de détection chez les salmonelles est de 4 (4 plasmides pour 12 souches) soit 3,25 %. Ces plasmides sont retrouvés chez :

--> *Salmonella typhi* avec 2,44 %

--> *Salmonella enteritidis* avec 0,81 %.

Les différents profils électrophorétiques montrent des plasmides de taille égale à : 2 ; 2.1 ; 2.3 ; 3.1 ; 3.3 et 5.4 Kb.

ZHANG L. (97) après électrophorèse sur gel d'agarose montre des plasmides de salmonelles de 98 MD (Mégadalton) ou 147 Kb. Ce plasmide code pour la résistance aux bêta-lactamines.

Les plasmides que nous avons observés sont de très petite taille et ne codent pas pour les bêta-lactamines.

Il est possible que ces plasmides codent pour la résistance aux autres antibiotiques, ou aux métaux lourds. Ils peuvent être des plasmides de virulence.

- Chez les *Klebsiellas*, la fréquence de détection est de 4 (4 plasmides sur 19 souches) soit 3,25 %. Ces plasmides ont des tailles de 3,3 ; 5,4 et 5,5 Kb.

Comparer aux résultats de KATSANIS G.P.(47), ces plasmides ont de 3,5 Kb et 7,9 Kb.

Par contre, chez les *E.coli*, seules 5 souches présentent un plasmide avec des tailles de 2.35 Kb, 1.57 Kb, 1.7 Kb et 4.8 Kb.(47)

Pour les *E.coli*, KATSANIS G.P.(47) a trouvé des plasmides de taille égale à 2.53 Kb codant pour la résistance à l'ampicilline (Ampi-R) alors que chez *E.coli* Ampi-S, le plasmide est de 1.57 Kb.(47)

Un autre plasmide de 7.9 Kb a été retrouvé chez *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli*. Ce plasmide ne code pas pour la résistance aux bêta-lactamines. Il est fort possible qu'il code pour la résistance aux métaux lourds ou aux autres antibiotiques.(47)

- La fréquence de détection de plasmide chez *Pseudomonas aeruginosa* est faible. Elle est de 4 (4 plasmides sur 18) soit un taux de 3.25 %. Ces plasmides sont identiques deux à deux et ont des tailles de 2.3 Kb et 4 Kb d'après leur profil électrophorétique.

RONCO E. (59) a caractérisé une nouvelle bêta-lactamase à large spectre médiée par des plasmides de taille égale à 80 Kb, 4 à 20 Kb et 2.2 Kb, codant pour la résistance aux céphalosporines. Ceci permet d'expliquer la résistance observée par les souches vis-à-vis de ces Céphalosporines. Ces valeurs sont proches des nôtres.

- Avec *H. influenzae*, une seule souche porte un plasmide. Ce plasmide (86) a observé chez *H. influenzae* un plasmide de 40 MD (= 6 Kb) codant pour la résistance à l'ampicilline.

IV.2 - Corrélation plasmides de résistance et sécrétion de bêta-lactamases

IV.2.1 - Les cocci

Sur un ensemble de 55 souches testées, seules 32 souches présentent à la fois un plasmide et une bêta-lactamase, soit 58,18 %.

Sur 14 souches de *S.aureus* Méti-S, 13 sécrètent une bêta-lactamase et une seule possède un plasmide. Ce plasmide étant de 2.3 Kb ne répond pas à la taille des plasmides codant pour la résistance aux bêta-lactamines.

Le nombre de plasmides étant très faible par rapport au nombre de souches produisant une bêta-lactamase, nous disons que la sécrétion de bêta-lactamase n'est pas liée au plasmide décelés. Il en est de même chez les autres cocci tels que *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. La production de bêta-lactamases y est beaucoup plus importante.

Les staphylocoques sont généralement résistants aux bêta-lactamines par production de pénicillinase.

La forte sécrétion de bêta-lactamases ne nous permet pas de dire que les souches sont toutes résistantes aux bêta-lactamines car le test à la nitrocéphine est très sensible et pour une très faible quantité de bêta-lactamase, il peut être positif. Ce test détecte même des bêta-lactamases de bas niveau.

SHOJI S. (81) au Japon, a démontré que les *S.aureus* Méti-R étaient plus fréquemment productrices de bêta-lactamases que les *S.aureus* Méti-S.

Il n'en est pas le cas dans notre étude, car 13 souches de MSSA sur 14 sécrètent une bêta-lactamase contrairement aux MRSA dont 14 sur 14 sécrètent une bêta-lactamase.

ERMOLINA G.B. (36) a fait une étude de l'activité des bêta-lactamases de staphylocoques par la technique acidimétrique et montre qu'il y a interaction entre la synthèse de bêta-lactamase par une souche de staphylocoque et sa résistance aux bêta-lactamines.

GEYID A. (37) a montré que 62 % des 76 souches de MRSA sont productrices de bêta-lactamases par les techniques iodimétriques rapides et nitrocéphine, de plus 80 % sont multirésistantes.

Parmi les 16 souches d'enterocoques, 8 souches sont productrices de bêta-lactamases et 3 ont un plasmide.

La résistance aux bêta-lactamines peut être d'origine plasmidique, d'origine enzymatique et elle peut être due à un transposon.

MURRAY B.E. (56) a démontré que *E.faecalis* HH 22 produisant une bêta-lactamase est résistante aux bêta-lactamines. HH 22 possède trois plasmides.

APARICIO P. (3) a démontré depuis 1990, que les souches de MRSA sont devenues épidémiques en Espagne et que la production de bêta-lactamase était codée par un plasmide de 39 Kb.

IV.2.2 - Les bacilles à Gram négatif

La résistance aux bêta-lactamines chez les bacilles a double origine : enzymatique et plasmidique.

--> Sur 14 souches de shigelles productrices de bêta-lactamases soit 100 %, 11 ont un plasmide soit 78,57 %.

Nous avons démontré plus haut que le plasmide trouvé de taille 3.2 Kb code pour la résistance aux bêta-lactamines.

La présence de plasmide peut induire cette sécrétion de bêta-lactamase

--> Chez les souches de *Proteus* étudiées 100 % sont productrices de bêta-lactamases (19 sur 19) et seules 11 possèdent un plasmide soit 78.57 %.

Les 10 souches de *P. vulgaris* ont un plasmide identique de 23 Kb, alors *P. vulgaris* héberge un plasmide de 2.3 Kb.

Les profils électrophorétiques obtenus avec les *P. mirabilis* correspondent plutôt à des fragments de DNA chromosomique. La résistance aux bêta-lactamines est d'origine chromosomique. Le plasmide de 2.3 Kb peut coder pour la résistance aux bêta-lactamines, car il existe selon WATANABE Y. (92) une nouvelle bêta-lactamase médiée par un plasmide dont la taille n'est pas encore connue.

--> 19 sur 19 souches de *Klebsiellas* produisent une bêta-lactamase et seulement quatre possèdent un plasmide. Egalement toutes les souches de *E. coli* sécrètent une bêta-lactamase et seules cinq possèdent un plasmide. *E. coli* et *Kl. pneumoniae* hébergent un même plasmide de 7.9 Kb, ne codant pas la résistance.

Selon BEN REDJEB S. (9), la résistance est due à la sécrétion de deux nouvelles transférables bêta-lactamases à large spectre codées par un plasmide de 150 Kb. Le reste des bacilles à Gram négatif sécrètent à 100 % une bêta-lactamase et sont tous porteurs de plasmide mais à de faibles taux. Certains de ces plasmides codent pour la résistance aux bêta-lactamines et les autres pour d'autres antibiotiques ou les métaux lourds.

Il n'y a aucune corrélation entre la sécrétion de bêta-lactamase et la détection de plasmide chez *H. influenzae*. Aucune souche ne possède un plasmide et une bêta-lactamase.

Il a été démontré que les souches d'*H.influenzae* contiennent un transposon particulier complet ou partiel appelé TnA (Transposon-Ampicilline) qui transporte le gène pour la variété TEM-1 de pénicillinase (78).

La pénicilline TEM-1 est très répandue parmi les bactéries Gram-négatif à cause de la capacité du TnA de s'insérer dans les plasmides divergents et les transferts des plasmides le contenant. Toutes les souches d'*haemophilus* contiennent seulement environ 40 % du TnA, cette part comprenant toutefois la séquence de codage de la pénicillinase et une de deux séquences terminales.

On ne sait pas comment le reste du transposon a été perdu, mais c'est probablement de manière fortuite, car le transposon doit être intact pour pouvoir sauter.

--> Parmi les 18 souches de *Ps.aeruginosa*, qui sont toutes sécrétrices de bêta-lactamases, seules deux possèdent un plasmide.

La corrélation est surtout marquée par RONCO E. (59) qui a démontré qu'il existe trois plasmides de 80 Kb, 20 Kb et 2.2-4 Kb qui codent pour la résistance aux bêta-lactamines. Cette résistance est due à la sécrétion de bêta-lactamase de type céphalosporinase.

Le plasmide trouvé dans notre travail, de 2.3 Kb peut être considéré comme un plasmide codant pour la résistance aux céphalosporines.

IV.3 - Corrélation plasmides/béta-lactamases et phénotype de résistance

VI.3.1 - Cocci

*** Vis-à-vis des Pénicillines**

Le maximum de cocci présentant à la fois un plasmide et une bêta-lactamase est retrouvé chez les souches résistantes à la pénicilline à l'association amoxicilline + acide clavulanique et à l'ampicilline.

Ce nombre est de trois souches sécrétrices et possédant un plasmide.

Nous notons également trois autres cocci, sécrétrices de bêta-lactamases et possédant un plasmide mais étant sensibles à l'ampicilline.

Ainsi, nous retenons que la résistance aux bêta-lactamines, plus exactement aux pénicillines est d'une part d'origine enzymatique (pénicillinase) et d'autre part plasmidique.

Nous notons également la présence d'une résistance inductible avec l'association Amoxicilline + Acide clavulanique.

*** Vis-à-vis des céphalosporines**

Les cocci présentaient une résistance uniquement aux Pénicillines d'où la synthèse de la méthicilline, mais il est apparu que quelques souches de *S. aureus* lui sont résistantes d'où la synthèse des Céphalosporines .

Dans notre travail, nous avons constaté des souches de cocci productrices de bêta-lactamases et possédant un plasmide, qui sont résistantes aux céphalosporines. Il s'agit de la céfazoline, ceftriaxone et la céfotaxime. Cette résistance aux bêta-lactamines est due à des bêta-lactamases médiées par des plasmides de résistance. Mais, elle peut également être d'origine enzymatique par sécrétion de céphalosporinases.

IV.3.2. Bacilles à Gram négatif

*** Vis-à-vis des Pénicillines**

Les bacilles à Gram-négatif sont très résistants vis-à-vis des pénicillines, il en est de même actuellement vis à vis des céphalosporines.

Les bacilles tels que *Shigella*, *E. cloacae*, *Ps. aeruginosa*, *Sal. typhi* et *enteritidis*, *E. coli*, *P. vulgaris* et *mirabilis* et *H. influenzae* qui sécrètent à la fois une bêta-lactamase et possèdent un plasmide sont également résistants à l'ampicilline, l'amoxicilline et l'association amoxicilline - acide clavulanique avec des pourcentages respectifs de 16.33 %, 23.08 % et 23.15 %.

L'utilisation de l'association Amoxicilline + Acide clavulanique a été conçu dans le but d'atténuer la résistance vis à vis de l'amoxicilline. Mais nous constatons une résistance vis à vis de l'association amoxicilline - acide clavulanique plus élevée qu'avec l'amoxicilline. Cette résistance peut être due:

- à l'effet innoculum
- à l'induction à faible dose de l'acide clavulanique sur les pénicillinases qui étaient à l'état de dormance.
- à la diminution de la concentration de l'acide clavulanique due à

l'association Amoxicilline + Acide clavulanique qui le dilue.

En général on fixe la concentration de l'acide clavulanique et on fait varier celle de l'amoxicilline.

Avec l'association amoxicilline + acide clavulanique, la résistance résulte de l'induction de l'acide clavulanique dans la production de bêta-lactamases.

La résistance peut également être due à une sécrétion de bêta-lactamases médiées par un plasmide.

La plus grande partie de nos souches de *E.coli* est résistante à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique. D'après BLAQUEZ J. (16), cette résistance est portée par un plasmide conjugatif de 45 Kb codant pour une seule bêta-lactamase.

La résistance à l'ampicilline chez *E.coli* est due à un plasmide de 2.53 Kb alors que les ampicillines sensibles, ont un plasmide de 1.57 Kb. (24)

ZHANG L. (97) a démontré par électrophorèse une bande plasmide de 98 MD (147 Kb) avec toutes les souches de salmonelles ampi-R hébergent des plasmides de 1.34 et 1.12 Kb.

Dans notre travail, les plasmides détectés ne codent pas pour la résistance à l'ampicilline.

Chez *Ps. aeruginosa*, la résistance à l'ampicilline (du fait d'une bêta-lactamase PSE-1) est due à un transposon Tn 1403 qui est de 19,9 Kb (90). C'est un élément transposable de classe II de la multirésistance originellement rencontré sur le plasmide RPL 11.

La résistance à l'ampicilline de *Salmonella typhi* est due à la production de TEM-1 bêta-lactamase et peu d'entre eux sécrètent AER-1, PSE-1 ou PSE-2.

* Vis-à-vis des céphalosporines

Les bacilles possédant un plasmide et sécrétant une bêta-lactamase sont en grande partie résistants aux céphalosporines telles que : céfazoline, ceftazidime, ceftriaxone et céfotaxime avec 18.28 %, 27.91 %, 18 % et 24.47 %.

Cette résistance à la ceftazidime est plus fréquente chez les *Klebsiellas* et *E. coli* que les autres. ROUVEAU (76bis) a montré une nouvelle bêta-lactamase : SHV-6, transférable à large spectre résistante à la ceftazidime à partir de *Klebsiella pneumoniae* SMITH CE (82) a démontré une nouvelle résistance de *Klebsiella pneumoniae* à la ceftazidime due à la sécrétion d'une nouvelle bêta-lactamase médiée par un plasmide de 150 Kb.

RASMUSSEN B.A.(71) a montré que les isolats de *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* résistants à la ceftazidime produisent une bêta lactamase médiée par un plasmide. Cette bêta-lactamase présente les mêmes caractères biochimiques que ceux de bêta-lactamase TEM-10. Les plasmides de ces deux souches sont encore non identifiés. Tout ce qu'on sait, c'est que le plasmide TEM-10 original est identique à celui trouvé dans *E. coli* et code pour un gène correspondant à la bêta-lactamase TEM-10 de Tn2.

La résistance aux autres céphalosporines céfotaxime, ceftriaxone est surtout enzymatique. Cette résistance enzymatique est due à la sécrétion de bêta-lactamase de type SHV-2 chez les salmonelles, SHV-4 chez les *Klebsiellas*. Chez *E. coli*, une céfotaximase plasmidique a été identifiée comme étant responsable de la résistance. Ce plasmide conférant la résistance à la céfotaxime est dénommée PMVP-3 qui est une bêta-lactamase à large spectre.

Klebsiella pneumoniae produit également une autre enzyme bêta-lactamase de type SHV-5 qui est transférable de *Klebsiella pneumoniae* à *E.coli* (4). Ce même plasmide est retrouvé chez les souches de salmonelles.

Une autre hypothèse concernant la forte résistance de *Klebsiella pneumoniae* à la céfotaxime. Cette résistance peut être due à un nouvel gène SHV-2a codé par un plasmide conjugatif de 66 Kb dénommé pZNP-1.

Un autre phénomène de transfert de bêta-lactamase est observé chez *Kl. pneumoniae* et à *Salmonella*. Cette bêta-lactamase transférée est de type TEM-3 (51).

La résistance des *Proteus* vis à vis des céphalosporines telle que ceftriaxone, céfotaxime est surtout d'origine chromosomique.

Retenons qu'actuellement, les bacilles à Gram négatif ont tendance à héberger des plasmides leur conférant ainsi le pouvoir de développer une résistance vis à vis des céphalosporines de troisième génération.

Les bêta-lactamases classiques médiées par un plasmide, peuvent voir leur spécificité vis à vis de l'hydrolyse d'un composé dénommé sta bêta-lactamase, tel que les céphalosporines de troisième génération, par une mutation en une étape et ensuite une sélection.

Bien qu'actuellement, ce mécanisme soit rare, il peut intervenir dans des situations cliniques spécifiques et des précautions doivent être prises pour prévenir.

CONCLUSION

Dans notre étude, nous nous sommes proposés de déterminer les facteurs de résistance surtout les plasmides de résistance au sein de la grande famille des cocci à Gram positif et des bacilles à Gram négatif, vis-à-vis des bêta-lactamines.

C'est ainsi que nous avons procédé :

- à l'étude de la résistance de ces germes vis-à-vis des bêta-lactamines
- à la recherche de la production de bêta-lactamases
- à l'extraction et à l'électrophorèse du DNA plasmidique.

Les résultats obtenus sur un ensemble de 188 souches ont permis d'aboutir à plusieurs conclusions

Sur l'ensemble des cocci testés, le fort taux de résistance observé avec:

- La pénicilline chez 68.75 % des souches de *E. faecalis*
- L'ampicilline et l'association Amoxicilline + Acide clavulanique respectivement chez 100 % et 90.91 % des souches de *S. epidermidis*
- Il en est de même des souches de *Staphylococcus aureus* qui résistent à l'association Amoxicilline + Acide clavulanique (71.43 %).

Vis-à-vis des céphalosporines le taux de résistance est beaucoup plus faible. La céftazidime donne le meilleur résultat avec les staphylocoques. Le pourcentage de sensibilité est de 100.

Certains bacilles à Gram négatif testés montrent une résistance plus élevée par rapport aux autres, cela vis-à-vis des céphalosporines.

Avec les céphalosporines, le plus faible taux est de 19 % avec *Escherichia* et le maximum obtenu est de 100 % avec les salmonelles et les shigelles.

Sur toutes les souches testées, les cocci comme les bacilles, nous avons constaté une résistance au moins à deux antibiotiques, cela pour chaque espèce bactérienne.

Nous avons préconisé le test à la "céfinase" pour sa simplicité, sa rapidité et sa rapidité d'exécution. Cette méthode est une technique très sensible. Les pourcentages de détection sont de :

- 83.64 % pour les cocci
- 87.2 % pour les bacilles.

Le seul inconvénient que présente cette méthode, est la détection d'autres enzymes qui n'interviennent pas dans la résistance bactérienne. Le fort taux de détection de bêta-lactamase nous a amené à poursuivre notre étude jusqu'à la recherche et la détection de plasmides de résistance.

Cette détection nécessite trois temps:

- la lyse bactérienne par la soude et SDS
- l'extraction du DNA plasmidique par un mélange phénol-chloroforme
- l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Parmi les souches sécrétrices de bêta-lactamase le nombre de plasmides trouvé lors de l'électrophorèse est de 6 sur 55 cocci soit 10.9 %.

Chez *S.aureus*, les bêta-lactamases ont leurs gènes le plus souvent portés par des plasmides. Ces bêta-lactamases sont généralement inductibles (leur production est accrue en présence de faible concentration de certaines bêta-lactamases comme la pénicilline G) plus généralement constitutives (leur production est d'emblée maximale).

Il s'est avéré que l'on a pas détecté de plasmides chez *S.aureus* méti-R et que chez les autres cocci, nous avons noté un très faible nombre de plasmides.

Nous avons déduit que la résistance aux bêta-lactamase de ces cocci est due soit :

- à une perte de plasmides lors des repiquages
- à un plasmide codant pour une pénicillinase
- à un transposon
- à un transfert de plasmide par conjugaison ou perméabilité membranaire du staphylocoque ou streptocoque (Enterocoque).

- à une modification des protéines de liaison aux Pénicillines (PLP5 et PLP5') des Enterocoques. PLP5 et PLP5' sont les cibles essentielles de la Pénicilline chez les enterocoques.

- à un DNA chromosomique.

Le nombre de plasmides détectés chez les bacilles est de 47 sur un total de 133 bacilles, soit un pourcentage de 35.3 % qui n'est pas négligeable.

Avec *Ps.aeruginosa*, la bêta-lactamase est médiée par 3 plasmides de taille 80 Kb, 20 Kb et 2.2 - 4 Kb codant pour les céphalosporines. Celui codant pour la résistance aux pénicillines est de 3.2 Kb.

Avec les *Proteus* le plasmide est de très grosse taille, supérieure à 23 Kb. Il est plus probable que cette résistance soit d'origine chromosomique.

Une bêta-lactamase FPM-1 transférable de *P.mirabilis* 6003 à *E.coli* 7004 a été démontrée médiée par un plasmide.

Avec *Enterobacter*, le plasmide codant pour la résistance aux bêta-lactamines à l'exception de la ceftriaxone et la céfotaxime est de taille 2.2 Kb et 5.3 KB.

Avec *Salmonella*, la résistance à l'ampicilline est médiée par un plasmide de 1.34 Kb ou 1.12 Kb.

Par contre chez *H.influenzae*, les 10 souches testées sont non sécrétrices de bêta-lactamases et une seule possède un plasmide. le seul plasmide détecté parmi les dix souches *Haemophilus influenzae* est un plasmide de transfert.

Donc la résistance observée vis à vis de l'association amoxicilline- acide clavulanique et l'Oxacilline n'est pas d'origine plasmidique mais enzymatique. Vis-à-vis des céphalosporines, nous avons noté une très bonne activité. Les tailles des plasmides fréquemment rencontrés lors de l'électrophorèse sont de : 2.3 ; 3.3 ; 9.4 et 2 Kb.

La méthode d'extraction par la lyse alcaline est excellente avec les bacilles alors qu'elle est moins performante avec les cocci.

Pour améliorer les chances d'obtenir des plasmides chez les cocci, il est impératif du fait des problèmes posés, des études se devront d'associer à cette méthode une enzyme complétant la lyse alcaline. Il s'agit de la lysostaphine ou lysosyme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ACAR J.F., Bouanchaud D. H. ET Buu-Hoi A.
Bactériologie Médicale, 2ème édition Flammarion Medecine Sciences, Paris, 1982
- 2 - ANDREWS A.T.
Electrophoresis Theory, Techniques, and biochemical and clinical applications, 2nd edition. Monographs on physical biochemistry Oxford Science Publications, Clarendon Press, 1986 Oxford p.452
- 3 - APARICIO P., RICHARDSON J., MARTIN S., VINDEL A., MARPLES RR., COOKSON BD.
An epidemic methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* in Spain.
Epidemiology & Infection. 1992, 108 (2): 287-98.
- 4 - ARCHAMBAUD M., GERBAUD G., LABAU E., MARTY N., COURVALIN P.
Possible in-vivo transfert of Beta-Lactamases TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonellae*.
J. Antimicrob. Chemother. 1991, 27(4): 427-36.
- 5 - ARTHUR M. et AL
Technique d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques.
L'antibiogramme mPc-Vidéom, 1ère Edition, Paris, 1985 : 251-305
- 6 - BAUERNFEIND A., HORL G.
Novel R-factor borne B-Lactamase of *Escherichia Coli* Conferring resistance to cephalosporins.
Infection 1978 ; 15 ; pages 257-9.
- 7 - BAUERFEIND A., ROSENTHAL E., EBERLEIN E., HOLLEY M., SCHWEIGHART S.
Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 Beta-Lactamase among hospitalized patients.
Infection. 1993, 21(1): 18-22.
- 8 - BENNAMI M.
Intérêt des inhibiteurs des B-Lactamases en antibiothérapie
Thèse méd., DAKAR, 1989, n° 4.
- 9 - BEN REDJEB S., FOURNIER G., MABILAT C., BEN HASSEN A., PHILIPPON A.
Two novel transferrable extended - spectrum B-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia.
FEMS Microbiology letters. 1990; 55(1-2): 33-38.
- 10 - Bingen E.
Mécanisme d'action des B-Lactamines
In "Mécanisme d'action des B-Lactamines de la structure B à la structure de la molécule".
Nice, Laboratoires ROUSSEL, 1986, pages 7-30
- 11 - BINGEN E.
Classification Structurale des B-Lactamines et relation structure activité.
In "mécanisme d'action des B-Lactamines et de la structure bacilles gram négatif à la structure de la molécule".
Nice, Laboratoires ROUSSEL, 1986, pages 47-62.

- 12 - BINGEN E.
Différentes classifications des Céfalosporine
In "Mécanisme d'action des B-Lactamines de la structure bactérienne à la structure de la bactérie".
Nice, Laboratoires ROUSSEL, 1986, pages 63-68
- 13 - BINGEN E.
Différents mécanismes de résistance bactérien aux
Béta-Lactamines In "mécanisme d'action des B-lactamines de la structure bactérienne à la structure de la molécule".
Nice Laboratoires ROUSSEL, 1986, pages 32-45
- 14 - BIO-RAD
DNA preparation from bacteria.
TM Gene Purification Matrix catalog - 732 - 6030, 1992,
Richmond.
- 15 - BIRNBOIM H.C. et DOLY J.
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res 1979, 7 p: 1513 - 1523
- 16 - BLAZQUEZ J., BAQUERO MR., CANTON R., ALOS I., BAQUERO F.
Characterization of a new TEM-type B-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of Escherichia coli.
J. Antimicrob. Agents & Chemother. 1993; 37(10):2059- 63.
- 17 - BOFFE S.A.
Agarose gel electrophoresis of DNA
Meth. Mol. Biol. 1984, 2 : 43-50
- 18 - BOYE C.S.B.
HVI et HIV2 en Afrique de l'Ouest, en Afrique Centrale et à Madagascar. Aspects virologique of epidemiologique.
Thèse Doctorat d'Etat es Sciences Pharm.
DAKAR, 1991 N°10 p:121-122
- 19 - CASALINO M., NICOLLETTI M., SALVIA A., COLONNA B., PAZZANI C., CALCONI A., KADIGIA A.M. et MAIMONE F.
characterization of endemic Shigella flexneri strains in Somalia: Antimicrobial resistance, plasmid profiles and serotype correlation.
J. Clin. Microbiol., 1994, 32(5):1179-83.
- 20 - CAUVALIN P.
les plasmides de résistance aux antibiotiques pages 59-70. In L.le Minor and M. Véron (éch), bactériologie médicale - Massan, Paris,
- 21 - CHABBERT Y. A.
Actualités Pharmacologiques,
26ème série. Edition de la Tourelle 1972, p 32
- 22 - CHABBERT Y.A
L'antibiogramme-sensibilité et résistance des bactéries aux ATB.
Collection Technique de base,
Edition de la Tourelle, Saint-Mandé, 1963

- 23 - CHANAL C., SIROT D., LABIA R., SIROT J.
Identification of two novel TEM - derivative - Ceftazidimases, CAZ-6 and CAZ-7, from *Klebsiella pneumoniae* isolates.
J Antimicrob Chemother, 1989, 24, p: 86-87.
- 24 - CHAVES J., ROY C., FUSTER C., REIG R., COIRA A.
Characterization of plasmids in *Escherichia coli* strains.
Enfermedades Infecciosasy Microbiologia clinica.
1993; 11(7):352-8.
- 25 - CHIN NX., GU JW., FANG W., NEU HC.
In vitro activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin.
Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.1992,15(4):331-7.
- 26 - CHIN NX., GU JW., FANG W. et NEU HC.
In vitro activity and B-lactamase stability of GR 69153, a new long-acting Cefalosporin
J. Antimicrob. Agents & Chemother.1991; 35(2): 259 - 66.
- 27 - CHIN NX., GU JW., NEW HC.
In vitro activity of cefcanel versus other oral cephalosporins.
Europ J. Clin. Microbiol. and Infect. Dis. 1991; 10(8): 672-82.
- 28 - COHEN S. et J SHAPIRO.
"Transposable Genetic Elements"
Scientific American, 1984, Vol.10, pages 245-46
- 29 - CRISTAL D., BURE A. M.;
Etat actuel de la résistance bactérienne in vitro aux antibiotiques.
Pathol. infect. et parasit. 1975, 2289-2305
- 30 - COIA J.E., NOOR-HUSSAIN I., PLATT D.J.
Plasmids profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-sensitive and methicillin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community.
J. Med. Microbiol.1988, vol 27 ; 271-276.
- 31 - CORKILL J.E., HART C.A., SHEAIS P.
Plasmid mediated ceftazidime resistance associated with a B-lactamase giving a slow nitrocefin reaction.
J. Antimicrob. Chemother., 1989, 24, 467-70.
- 32 - DAVIS L.G., DIBNER M.D., BATLEY J.F.
Basics Methods in Molecular Biology
Elsevier, New-York, 1986, 398 pages
- 33 - DIALLO O.K.
Evaluation des mécanismes de résistance aux Béta-Lactamines et aminosides de souches Dakaroises de *Staphylocoques* et *Streptocoques*.
Thèse Pharm.Dakar, 1993, N° 60.

- 34 - DIENE P.M.
Activité antibactérienne "in vitro" de l'aztréoram sur les bacilles à Gram négatif hospitaliers (étude des CMI chez 100 souches isolées au CHU de DAKAR en 1986).
Thèse pharm., DAKAR, 1986, n° 78.
- 35 - DESCHASEAUX M.L., JOUVENOT M., ADESSI G.L., MICHEL-BRIAND Y.
Two presumed novel B-lactamases in members of the family enterobacteriaceae.
J Antimicrob. Chemother. 1988, 21, 133-5.
- 36 - ERMOLINA GB., DEGTEVA GK., NOSOVA TV., SHUBINA ZV.
Study of Beta-Lactamase activity of staphylococci from different sources Russians.
J. Antibiot .Kiikhimiotherapiia. 1991, 36(2): 19-21.
- 37 - GEYID A., LEMENEH Y.
The incidence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in clinical specimens in relation to their Beta-Lactamase producing and multiple drug resistance properties in Addis-Abeba.
J. Ethiopian Medical. 1991, 29(4): 149-61.
- 38 - GRATTARD F., POZZETTO B., BERTHELOT P., RAYET I., ROS A., LAURAS B., GAUDIN O.G.
Arbitrarily primed PCR, ribotyping and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to Enterobacter cloacae in a neonatal intensive care unit.
J. Clin. Microbiol. 1994, 32(3): 596-602.
- 39 - GUTMANN L.
Résistance des entérocoques aux Béta-lactamines et conséquences sur les synergies.
Méd Mal Infect. 1994, 24(spécial): 165-71.
- 40 - GUTMANN L., FERRE B., GOLDSTEIN F.W., RIZK N., PINTO - SCHUSTER E., ACARJ.F., COLLATZ E.
SHV-5, a novel SHV - type B-Lactamase that hydrolyzes broad - spectrum cephalosporins and monobactams.
J. Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33, 951-6.
- 41 - GUTMANN L., KITZIS M., BILLOT - KLEIN D., GOLDSTEIN F., TRAN VAN NHIEU G., LU T. et Al.
Plasmid-mediated B-Lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam.
Rev. infect. Dis. 1988 ; 10 ; 860-866.
- 42 - HAMELIN C.
A simple electrophoresis system for multiple agarose slab gels.
Anal. Biochem., 1980, 108 : 207 - 211.
- 43 - HAMELIN C., DION M. et YELLE J.
Analysis of recombinant plasmids using multiple agarose slab gels in series.
Gene Anal. Tech. 1984 1 : 79-83.

- 44 - CHANAL C.M., SIROT D.L., PETIT A., LABIA R., MORAND A.,
SIROT J.L., CLUZEL R.A.
Multiplicity of TEM derived B-lactamases from Kleb pneumoniae strains isolated of the same hospital and relationships between the responsible plasmids.
J. Antimicrob. Agents Chemother., 1989, 33, p: 1915 - 1920.
- 45 - HOHL P.
Laboratory instructions for "in vitro" dilution antibacterial susceptibility testing using the cephalosporin Ro - 40 - 6890 and for in vivo testing using the cephalosporin ester prodrug Ro - 41 - 3399
Labo ROCHE RESEARCH EXPORT, 1991, n° B 158'605.
- 46 - JARLIER V., NICOLAS M.H., FOURNIER G., PHILIPPON A.
Extended broad - spectrum B-Lactamases conferring transferable resistance to newer B-Lactamases agents in enterobacteriaceae hospital prevalence and susceptibility patterns.
Rev. Infect. Dis; 1988 ; 10 ; 867-878.
- 47 - KATSANIS G.P., SPARGO J., FERRARO M.J., SUTTON L. et JACOBY J.A.
Detection of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains producing Extended-Spectrum B-lactamases.
J. Clin. Microbiol., 1994; 32(3):691-96.
- 48 - KING A., BOOTHMAN C., PHILLIPS I.
Comparative in vitro activity of cefpirome and cefepime, two new cephalosporin.
Europ J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis. 1990; 9(9): 677 - 85.
- 49 - KLIEBE C., NIES B.A., MEYER J.F., TOLXDORFF NEUTZLING R.M.,
WIEDMANN B.
Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins
J. Antimicrob. Agents Chemother., 1985 ; 28 ; 302-307.
- 50 - Le Minor L., VERON N.
Bacteriologie médicale, 2ème édition Flammarion, Medecine sciences, Paris, 1989 ; 333-381, 773-828
- 51 - LING JM., ZHOU GM., WOO TH., FRENCH GL.
Antimicrobial susceptibilities and Beta-Lactamase production of Hong-Kong isolates of gastroenteric salmonellae and Salmonella typhi.
J. Antimicrob. Chemother. 1991, 28(6): 877-85.
- 52 - MATSUMOTO Y., IKEDA F., KAMIMURA T., YAKOTA Y., MINE Y
Novel plasmid-mediated B-Lactamase from E. Coli that inactivates oxymino-cefalosporin
J. Antimicrob. Agents Chemother. - 1988 ; 32 ; 1243-6.
- 53 - MEDEIROS A.
B-lactamase
Brit. Med. Bull, 1984; 40: 18 - 27.

- 54 - MELO CRISTINO J.A.G., TORRES PEREIRA A. and ANDRADE L.G.
Diversity of plasmids in *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract infections in women.
Epidem. Inf. 1989, 102, 413-419.
- 55 - MOAT N.
Les nouvelles B-Lactamines
Méd. Mal. Infect., 1987, n° spécial, pages 43-48.
- 56 - MURRAY BE., ANFY., CLEWELL DB.
Plasmids and phenomene response of the Beta-Lactamase producer *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* HH 22.
J. Antimicrob. Agents Chemother., 1988, 32 (4): 547-51.
- 57 - NEU HC., GU JW., FANG W., CHIN NX.
In vitro activity and susceptibility to hydrolysis of S-1006.
J. Antimicrob. Agents & Chemother., 1992; 36(6): 1336 - 41.
- 58 - NEWMAN M.
Vademecum des antibiotiques
Maloine S.A., Doin S.A., Paris, 1975, 124-126
- 59 - NORDMAN P., RONCO E., NAAS T., DUPORT C., MICHEL-BRIAND Y., LABIA R.
Characterization of a novel extented-spectrum B-lactamase from *Pseudomonas aerusginosa*.
J. Antimicrob. Agents & Chemother. 1993; 37(5): 962-9.
- 60 - NOVICK R. P.
Les plasmides.
Pour la science, 1989, Vol 12, page 50
- 62 - PAUL G. C., GERBAUD G., BURE A., PHILIPPON A.M., PANGON B., COURVALIN P.
TEM-4, new plasmid mediated B-Lactamase that hydrolyzes broad spectrum cepholosporins in a clinical isolate of *E.coli*
J. Antimicrob. Agents Chemother., 1989, 33: 1958-63.
- 63 - PAYNE D.J., AMYES S.G.B.
Transferable resistance to extended - Spectrum B-Lactamases : a major treat or a minor inconvenience ?
J. Antimicrob. Chemother., 1991, (27), p. 253 - 61.
- 64 - PAYNE D.J., BLACHMORE P.H., DRABA J., AMYES S.G.B.
Comparison of TEM-3 and TEM-5 B-lactamase.
J. Antimicrob. Chemother. 1989; 24: 615-17.
- 65 - PAYNE D. J., HOOD J., MARIOTT M. S., AMYES S. G. B.
Separation of plasmid, mediated extended spectrum B-lactamase by fast protein liquid chromatography (FPLC).
FEMS Microbiol Letters. 1990; 69: 195 - 200.
- 66 - PAYNE D. J., MARIOTT M. S., AMYES S. G. B.
Characterization of a unique ceftazidime - hydrolysing béta-lactamase. TEM-E2.
J. Med Microbiol. 1990; 32: 131 - 134.

- 67 - PAYNE D. J., MARRIOTT M. S., AMYES S. G. B.
TEM-El: a novel B-lactamase conferring resistance to ceftazidime.
FEMS Microbiol Letters. 1989; 59: 97 - 100.
- 68 - PETIT A., SIROT D. L., CHANAL C. M., SIROT J. L., LABIA R., GERBAUD G., CLUZEL R. A.
Novel plasmid - mediated B-lactamase in clinical isolates of *Klesiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad - spectrum cephalosprins.
J. Antimicrob. Agents chemother., 1988, 32: 626 - 630.
- 69 - PEPPER K., HORAUD T., LE BOUGUENEC C., DE CESPEDES G.
Location of antibiotic resistance Makers in clinical isolats of *Enterococcus faecalis* with simular antibiotypes.
J. Antimicrob. Agents Chemother. 1987, 31 (9):1394-402
- 70 - QUINN J. P, MIYASHIRO D., SAHM D., FLAMM R., BUSH K.
Novel plasmid - mediated B-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klesiella pneumoniae*.
J. Antimicrob. Agents Chemother., 1989; 33: 1451 - 1456.
- 71 - RASMUSSEN B.A., BRADFORD P.A., QUINN J.P., WIENER J., WEINSTEIN R.A., BUSH K.
Genetically divers ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 Beta-Lactamases encoded by different nucleotide sequences.
J. Antimicrob. Agents & Chemother. 1993, 37(9):1989-92.
- 72 - REINER R.
Antibiotics : an introduction
Edition "Roche", sc. service, Basle, 1982.
- 73 - RICE LB., MARSHALL SH.
Evidence of incorporation of the chromosomal B-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH 19 into a transposon derived from staphylococci.
J. Antimicrob. Agents & Chemother. 1992, 36(9): 1843-6.
- 74 - RICHMOND M. H. & SYKES R. B. in ROSE A. H. & TEMPEST D. W. (ed).
Advances in Microbial Physiology.
Academic press, 1973; 9: 31 - 88.
- 75 - RICHMOND M. H., in SATTON M. & SHOCKMAN G. D. (ed)
B-lactamase antibiotics.
Academic press, 1981; 261 - 273
- 75BIS ROBERT C., COOKSEY K.
Mechanism of resistance to antimicrobial agents.
Antimicrobial Agents and susceptibility tests.
- 76 - ROBERTA F., AMALFITANO G., ROSSI L. and SATTA G.
Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by B-lactam antibiotics in *Enterococci*.
Clin. Infect. Dis., 1992, 15: 486-9.

- 77- **SAMBROOK J., FRITSITI E. F. et T. MANIATIS**
Molecular cloning a laboratory manual/2nd ed.,
New York 1989, 1. 25-18
- 78 - **SAUNDERS J.R ET AL.**
B-lactamases and R- plasmids of Hemophilus influenzae.
Tempo medical, 1981.
- 79 - **SCHEIF R.F. of WENSINK P.C.**
Practical Methods in Molecular Biology
Springer. Verlag., New York, 1981 p:220
- 80 - **SEALEY P.G. et SOUTHERN E.M.**
Gel electrophoresis of DNA
Dans Gel electrophoresis of Nucleic Acids : A practical Approach
- IRL Press Ltd, Oxford,1982, p : 39-76.
- 81 - **SHOJI S., KIKUCHI H., WATANABE A.,MOTOMIYA M.**
The Beta-Lactamase activity in methicillin-resistance
Staphylococcus aureus a comparison of the Beta-Lactamase from
a methicillin-resistant from a methicillin-sensitive strain of
Staphylococcus aureus Japaneses.
Japan. J. Clin. Med.,1992, 50 (5): 1049-53.
- 82 - **SIROT D., CHANAL C., LABIA R., MEYRAN M., SIROT J., CLUZEL R.**
Comparative study of live plasmid - mediated ceftazidimases
isolated in Klebsiella pneumoniae.
J. Antimicrob. Chemother.1989, 24: 509 - 21.
- 83 - **SIROT J., CHANAL C., PETIT A., SIROT D., LABIA R., GERBAUD G.**
Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae producing
novel plasmid mediated B-lactamase markedly active against third
generation cephalosporins epidemiologic studies.
Rev. Infect. Dis. 1988, 10: 1290 - 3
- 84 - **SMITH C. E., TILLMANN B. S., HOWELL A. W., LONGFIELD R. N.,
JORGENSEN J. H.**
Failure of ceftazidime -amikacin therapy for bacteremia and
meningitis due to Klebsiella pneumoniae producing an extended -
spectrum B-lactamase.
Antimicrob. Agents Chemother.1990, 34: 1290 - 3.
- 85 - **SMITH C.E., TILLMAN B.S., HOWELL A.W., LONGFIELD R.N.,
JORGENSEN J.H.**
Failure of ceftazidime - amikacin therapy for bacteremia and
meningitis due to Klebsiella pneumoniae producing an extended -
spectrum B-lactamase.
J. Antimicrob. Agents & chemother.1990, 34(6):1290-3.
- 86 - **STURM A.W., MOSTERT R., ROUING P.J.; VAN KLINGEREN B.;
VAN ALPHEN L.**
Outbreak of multiresistant non-encapsulated Haemophilus
influenzae infections in a pulmonary rehabilitation center.
Lancet; 1990; 335(8683): 214-6.

- 87 - SYKES R. B. & MATTHEW M.
J. Antimicrob. Chemother.1976; 2: 115 - 117.
- 88 - TOBITA M., NAKAGOMI O., UESUGI S.
Microbiological characterization of clinical isolates of
Staphylococcus epidermidis.
J. Japan. Ass. Infect. Dis.1991, 65 (5): 540-5.
- 89 - THABAUT A., MEYRAN M. - Hôpital militaire de Bégin
Nouvelles B-Lactamines - Essai de classification relation
structure - activité
Tempo méd., n° 78, A.. 1981
- 90 - VEZINA G., LEVESQUE RC.
Molecular characterization of the class 2 multiresistance
transposable element Tn 1403 from Pseudomonas aeruginosa.
J.Antimicrob. Agents & Chemother.,1991, 35(2): 313-21.
- 91 - WADJ S.D.
Etude comparative de différentes méthodes de détections des B-
lactamases sur des souches bactériennes isolées à DAKAR.
Thèse Pharm., DAKAR, 1993, n° 84.
- 92 - WATANABE Y., YOKOTA T., HIGASHI Y., WAKAI Y., MINE Y.
In vitro and in vivo transferable B-lactamase resistance due to
a new plasmid - mediated oxyiminocephalosporinase from a
clinical isolate of Proteus mirabilis.
Microb. Immunol.1991; 35(2):87-97.
- 93 - WIEDEMANN B.
Plasmid - mediated extended spectrum beta-lactamases.
Méd. Mal. infect. - 1992, 22, p:525-28
- 94 - WILLIAMSON R., COLLATZ E., GUTMANN L.
Mécanismes d'action des B-Lactamines et mécanismes de résistance
non enzymatique.
Résist., Méd., 1986, 15, n° 46
- 95 - WOODFORD N., PAYNE D. J., JOHNSON A. P., WEINBREIN M.J.,
PERINPANAYAGAM R. M., GEORGE R. C al.
Transferable cephalosporin resistance not inhibited by
clavulanate in Escherichia Coli.
Lancet; 1990; 336: 253.
- 96 - YADE S
Etude comparative de l'activité "in vitro" d'une nouvelle
céfalosporine Ro-40-6890 et de différents antibiotiques sur des
souches bactériennes isolées à DAKAR.
Thèse pharm. DAKAR, 1993, n° 59.
- 97 - ZHANG L.
Mechanism of multiresistant Salmonella typhi.
Chung-Hua ittsuch Tsa Chih., 1991; 71(6): 314-7.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

VU
LE PRESIDENT DU JURY

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'A' with a long vertical stroke extending downwards.

VU
LE DOYEN

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'D' with a long vertical stroke extending downwards.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR

