
UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2003

N°

MEMOIRE

DU **DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE**
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le **16 juin 2003**
Par Mr. **WUILLEME Xavier**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 10 Septembre 1990 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE **DOCTEUR EN PHARMACIE**

ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DE 16 SOUCHES
D'ACHROMOBACTER (ALCALIGENES) XYLOSOXIDANS ISOLEES DE PATIENTS
ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE, À NANTES DE 1998 A 2001.

JURY

PRESIDENT:	Mme le Professeur	B.M. IMBERT	laboratoire de Virologie – Nantes
DIRECTEUR :	Mr le Docteur	J. CAILLON	laboratoire de bactériologie – Nantes
MEMBRES :	Mr le Professeur	H.B. DRUGEON	laboratoire de bactériologie – Nantes
	Mr le Professeur	G. POTEL	Laboratoire de thérapeutique – Nantes
	Mr le Docteur	A. HALOUN	Service de pneumologie – Nantes

A Madame le professeur B.M. IMBERT,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

A Monsieur le professeur H. B. DRUGEON,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail,
Vous m'avez accueilli dans votre service.
Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur G. POTEL,

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire,
Veuillez trouver ici mon profond respect et ma reconnaissance

A Monsieur le Docteur A. HALOUN,

Vous me faite le plaisir et l'honneur de juger ce travail,
Veuillez trouver ici l'expression de toute ma considération.

A Madame le docteur J. CAILLON,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail.

Ce fut pour moi surtout un plaisir.

Tout au long de l'apprentissage de la spécialité, j'ai pu, comme beaucoup d'autres,

admirer votre disponibilité et votre dévouement,

vos écoute, votre patience, votre rigueur,

vos honnêteté

et l'étendue de vos connaissances.

Puisse ce travail être le témoignage

de mon profond respect et de mon admiration.

Je dédie cette thèse,

A Soraya,

Qui m'a toujours soutenu.
En témoignage de notre Amour.
Avec toute ma tendresse.

A Sarah, Elise et Erwan,

Vous faites de moi le plus heureux des papas.

A mes parents,

Pour votre soutien et l'amour que vous me portez
Vous faites de moi le plus heureux des fils

A mes frères et sœurs

Recevez le témoignage de mon affection

A ma belle-famille

A toute l'équipe du laboratoire,

Pour votre sympathie, votre dévouement,
Merci

Aux lapins qui ont périés sous ma mains

ABBREVIATIONS

Liste des abréviations

<i>A.xylosoxidans</i>	:	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
Ac. clav.	:	Acide clavulanique
AN	:	Amikacine
ATM	:	Aztréonam
BCC	:	Bouillon cœur cerveau
CASFM	:	Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ	:	Ceftazidime
CFTR	:	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CMI	:	Concentration minimale inhibitrice
CS	:	Colistine
CTX	:	Céfotaxime
CXM	:	Céfuroxime
FEP	:	Céfépime
FOS	:	Fosfomycine
FOX	:	Céfoxitine
MH	:	Mueller-Hinton
IPM	:	Imipénème
MEM	:	Méropénème
MOX	:	Latamoxef
<i>P. aeruginosa</i>	:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pI	:	Point isoélectrique
PIP	:	Pipéracilline
STX	:	cotrimoxazole (triméthoprim + sulfaméthoxazole)
TCC	:	Ticarcilline + acide clavulanique
TEM	:	Témocilline
TM	:	Tobramycine
TZP	:	Pipéracilline + tazobactam

PLAN

1^{ère} partie : Données bibliographiques

A. GENERALITES SUR *ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS*

I.	<u>Données taxonomiques – Rappels historiques</u>	p13
I.1	Le genre <i>Alcaligenes</i>	p13
I.2	Le genre <i>Achromobacter</i>	p13
I.3	Evolution des 2 genres	p13
II.	<u>Habitat – Epidémiologie - Pouvoir pathogène d'<i>Achromobacter xylosoxidans</i></u>	p20
II.1	Habitat – Epidémiologie	p20
II.2	Pouvoir pathogène	p22
III.	<u>Caractères bactériologiques</u>	p28
III.1	Morphologie	p28
III.2	Caractères culturels.....	p30
III.3	Identification	p30
III.4	Diagnostic différentiel de genre et d'espèce avec les autres bacilles à Gram négatif oxydase positive	p31
IV.	<u>Sensibilité et résistance aux antibiotiques</u>	p33

B. ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS ET MUCOVISCIDOSE

I.	<u>Introduction</u>	p36
II.	<u>Aspects microbiologiques de la mucoviscidose</u>	p39
II.1	<u>Généralités</u>	p39
II.2	<u>Germes impliqués dans les infections broncho-pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose</u>	p40
II.3	<u><i>Achromobacter xylosoxidans</i></u>	p45
II.4	<u>Traitements</u>	p47

2^{ème} partie

Etude de 16 souches issues de patients atteints de mucoviscidose à Nantes

Objectifs de l'étude.....	p50
Matériel et méthodes.....	p52
1. Origine des souches.....	p53
2. Etudes in vitro.....	p53
2.1 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.....	p53
2.2 CMI en milieu gélosé	p55
2.3 Etudes d'associations.....	p56
2.4 Electrophorèse en isofocalisation.....	p56
2.5 Etude génomique.....	p59
3. Méthode in vivo.....	p61
Résultats	p65
A. Etudes in vitro.....	p66
I. Caractères bactériologiques.....	p66
II. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	p66
II.1. Comportements de 16 souches vis-à-vis de 15 $\square$ -lactamines par la technique de diffusion en milieu gélosé.....	p66
II.2. Autres antibiotiques.....	p75
III. Détermination des CMI de 7 β -lactamines vis-à-vis des 16 isolats.....	p78
IV. Associations d'antibiotiques.....	p78
IV.1. Milieu gélosé.....	p78
IV.2. Vitesse de bactéricidie.....	p78
V. Détermination des points isoélectriques des $\square$ -lactamases pour 13 souches	p85

VI. Etude génomique..... p87

B. Etudes in vivo..... p91

Discussion.....	p93
-----------------	-----

Conclusion – perspectives	p102
---------------------------------	------

Bibliographie	p104
---------------------	------

Listes des figures.....	p116
-------------------------	------

Listes des tableaux.....	p119
--------------------------	------

1^{ère} partie :

Données bibliographiques

A. GENERALITES SUR
ACHROMOBACTER (Alcaligenes)
XYLOSOXYDANS

I. Données taxonomiques – Rappels historiques

Les genres *Alcaligenes* et *Achromobacter* ont souvent été, par le passé, composés de multitudes de bactéries pour la plupart mal caractérisées. Les raisons en étaient d'une part une description peu discriminante des genres et d'autre part une inactivité de ces bactéries à la plupart des tests biochimiques usuels.

I.2 Le genre *Alcaligenes*

Petruschky, en 1896, donne le nom de *Bacillus faecalis alcaligenes* à un bacille non sporulé d'origine intestinale, n'acidifiant pas les sucres et ne produisant pas de réaction alcaline avec le lait. La bactérie est renommée *Bacillus alcaligenes* par Migula en 1900, puis *Alcaligenes faecalis* par Castellani et Chalmers en 1919, ces derniers créant ainsi le genre *Alcaligenes* (Castellani et Chalmers, 1920).

Ce genre est alors classé dans la famille des *Bacillaceae*, tribu des *Ebertheae* et regroupe des bacilles à Gram négatif, mobiles (grâce à une ciliature péritriche) ou immobiles, produisant une réaction alcaline avec le lait, n'utilisant pas les carbohydrates, ne produisant pas d'acétylméthylcarbinol, étant généralement isolés du tube digestif des vertébrés, et pouvant donner des colonies pigmentées (Hendrie, 74)

L'espèce type est *Alcaligenes faecalis*.

La définition du genre *Alcaligenes* est adoptée sans modification, par la classification américaine (Bergey, 1923) et la classification française (Prévot, 1948). Toutefois, dans la classification américaine, ce genre est le premier de la famille des *Achromobacteriaceae*, alors que dans la classification française, il est le quatrième genre de la tribu des *Salmonelleae*, troisième tribu de la famille des *Enterobacteriaceae*. (Brisou, 1953).

Hugh et Leifson, en 1953 (*Hugh et Leifson*, 1953), Leifson, en 1960 (*Leifson*, flagellation, Academic Press, 1960), distinguent parmi les bacilles inactifs sur les hydrates de carbones trois types morphologiques : péricitriches, lophotriches, monotriches, qu'ils proposent de classer respectivement dans les genres *Alcaligenes*, *Lophomonas* ou *Pseudomonas*. Et ceci, bien que plusieurs publications incitent à considérer avec prudence les arguments taxinomiques fondés sur la disposition polaire ou péricitriche de l'appareil locomoteur (*Thibault*, 1961)

Hugh et Leifson décrivent en 1954 l'espèce *Alcaligenes denitrificans*, qui se distingue d'*Alcaligenes faecalis* par sa capacité à réduire les nitrates jusqu'au stade gaz nitreux et à croître en anaérobiose par respiration des nitrates ou des nitrites (utilisés comme accepteur final d'électrons) (*Leifson et hugh*, 1954).

I.1. Le genre *Achromobacter*

Le genre *Achromobacter* (*Achromus* : sans coloration ; *Bacteria* : bâton) est décrit par Bergey en 1923 et apparaît dans la première édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (*Bergey*, 1923). Il regroupe alors des « bâtonnets asporulés non pigmentés sur gélose ou gélatine, mobiles par cils péricitriches ou immobiles, Gram négatifs, vivant dans les eaux et les sols. »

Il constitue le deuxième genre de la famille des *Achromobacteriaceae* (le premier étant *Alcaligenes*) et il comprend 12 espèces dont la clef repose sur la mobilité, l'attaque de la gélatine, la réduction de nitrates et l'action sur le lait.

L'espèce type est *Achromobacter liquefaciens*.

En France, le genre *Achromobacter* a la même définition que celle du Bergey's Manual et appartient au genre I de la tribu des *Achromobactereae*, famille des *Pseudomonadaceae* (*Magrou et Prévot*, 1948).

En 1971, puis 1974, Yabuuchi et Ohyama décrivent les caractéristiques d'un bacille Gram négatif isolé de pus d'otite et crée l'espèce *Achromobacter xylosoxydans*, qu'ils proposent comme espèce type du genre *Achromobacter* en 1981. L'uniformité de la morphologie flagellaire, des réactions biochimiques, de la composition cellulaire en lipides et acides gras, et du coefficient GC pour-cent de 55 souches isolées chez des patients permet d'établir l'homogénéité de l'espèce (*Yabuuchi*, 1974).

L'absence de souche disponible d'*Achromobacter liquefaciens*, souche type du genre, rend impossible la comparaison avec *Achromobacter xylosoxidans*.

I.3 Evolution des deux genres

Certains auteurs vont tenter de regrouper les espèces des deux genres, estimant qu'aucun critère sérieux ne permet de les différencier.

Ainsi, en 1953 puis 1954, Brisou et Prévot, considérant que les espèces réunies dans le genre *Achromobacter* forment un ensemble beaucoup trop hétérogène, révisent leur taxonomie, notamment en incorporant les espèces réunies sous le terme *Alcaligenes* dans le genre *Achromobacter*, et en réduisant les quelque 130 espèces décrites dans la littérature à 51 espèces et variétés (Brisou et Prévot, 1953).

P. Thibault, dans un article consacré à *Alcaligenes faecalis*, trouve tout à fait séduisante la proposition de Brisou et Prévot de supprimer le genre *Alcaligenes* et de regrouper dans le genre *Achromobacter* ses différentes espèces (P. Thibault, 1961).

En 1974, Hendrie et coll. proposent une révision des genres *Alcaligenes* et *Achromobacter*. Ils soulignent les insuffisances dans les descriptions des deux genres, dont les plus récentes datent respectivement de 1923 et 1957. Les seules différences résident en effet dans l'origine des isolats : l'environnement extérieur pour *Achromobacter* et le tube digestif pour *Alcaligenes*. L'absence de fermentation, qui est un critère important de différenciation des espèces du genre *Alcaligenes* dans les éditions successives du Bergey's Manual of determinative Bacteriology, n'a jamais été précisée pour le genre *Achromobacter*. D'autre part, s'il existe une souche de référence pour le genre *Alcaligenes*, il n'existe pas de culture d'*Achromobacter liquefaciens* (Hendrie, 1974).

A partir de ces données, et après l'étude de 270 souches classées antérieurement dans les deux genres, Hendrie et coll. proposent de regrouper dans le genre *Alcaligenes* les souches bactériennes répondant à la définition suivante : bacilles à Gram négatif, mobile par ciliature péritriche, à métabolisme respiratoire, aérobie stricte, oxydase positive, le GC % allant de 58 à 70 mol % (Hendrie, 1974).

D'autre part, considérant qu'il n'existe aucun critère sérieux permettant de différencier les deux genres, les auteurs proposent de considérer le genre *Achromobacter* comme nomen dubium, et donc de rejeter ce nom de genre ; le genre *Achromobacter* disparaît de la 8^{ème} édition du Manual of Determinative Bacteriology (Holding, 1974) et plus d'une centaine d'espèces sont transférées dans d'autres genres bactériens.

En 1981, Yabuuchi réintroduit l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* qu'il considère comme l'espèce type du genre (Yabuuchi and Yano, 1981). Cependant, il demeure absent de la nomenclature jusqu'à son rattachement au genre *Alcaligenes* et sa description dans la première édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Kerstens, 1984).

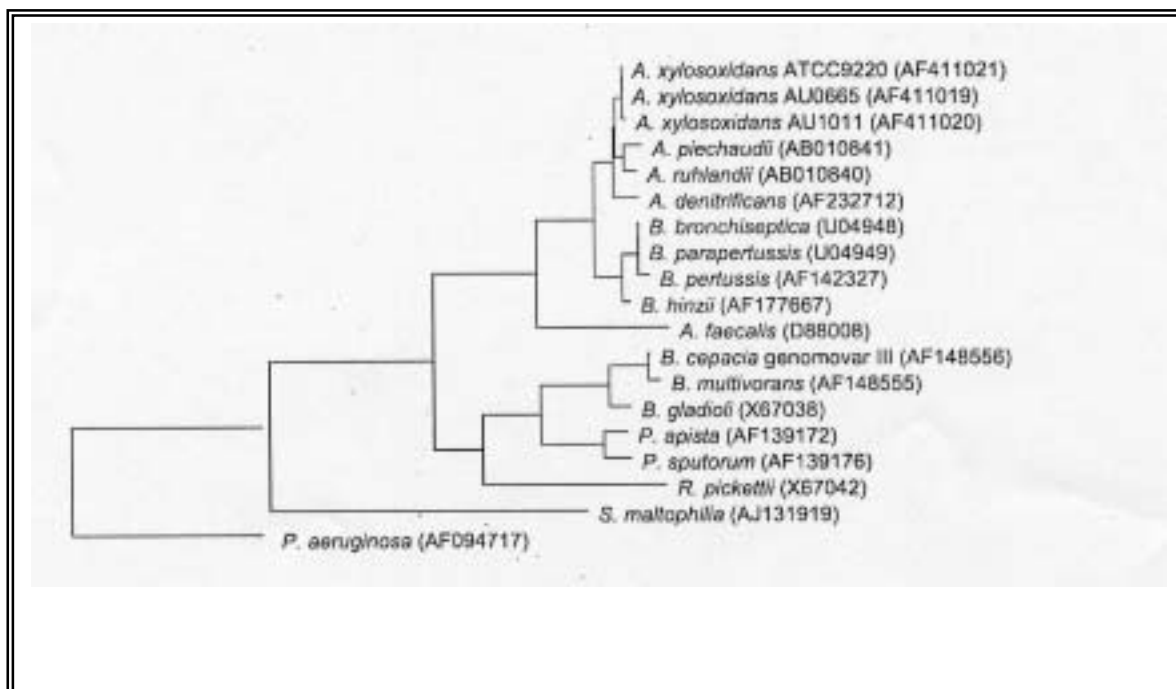
Après différentes études portant sur les espèces marines et dulçaquicoles du genre *Alcaligenes*, Kiredjian et Lemelin définissent, en 1981, 4 espèces composant le genre *Alcaligenes* en se basant sur des critères phénotypiques et génotypiques (Kiredjian, 1981) :

- ☞ *Alcaligenes faecalis* (souche type : ATCC 8750), espèce type du genre
- ☞ *Alcaligenes xylosoxidans* (souche type : ATCC 27061)
- ☞ *Alcaligenes denitrificans* (souche type : ATCC 15173), ne diffère d'*A. xylosoxidans* que par son absence d'acidification du D-glucose et du D-xylose
- ☞ *Alcaligenes piechaudii* (souche holotype : CIP 6075), nouvelle espèce n'assimilant aucun hydrate de carbone

En 1986, De Ley et coll. propose une nouvelle famille : *Alcaligenaceae*, regroupant des cocco-bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature pérित्रique ou non mobile, aérobie strict, certaines souches pouvant respirer les nitrates ou les nitrites, dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C. Les colonies sont généralement non pigmentées, la plupart des souches sont catalase et oxydase positive, une réaction alcaline est observée avec le lait, la gélatine n'est pas hydrolysée, les carbohydrates ne sont généralement pas utilisés, à l'exception de quelques souches utilisant comme source de carbone le D-glucose et/ou le D-xylose. Le genre type est *Alcaligenes* Castellani et Chalmers 1919 (De Ley, 1986).

C'est aussi en 1986 que Kiredjian considérant que l'épithète « *xylosoxidans* » a la priorité, rend illégitime l'épithète « *denitrificans* ». Les deux sous-espèces suivantes sont proposées : *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* et *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*.

Enfin, en 1998, en se basant sur la séquence de l'ARNr 16S, Yabuuchi réintroduit le genre *Achromobacter*, avec les deux sous-espèces, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (souche type : ATCC 27061) et *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (souche type : ATCC 15173).



Achromobacter et espèces associées (Liu, 2002)

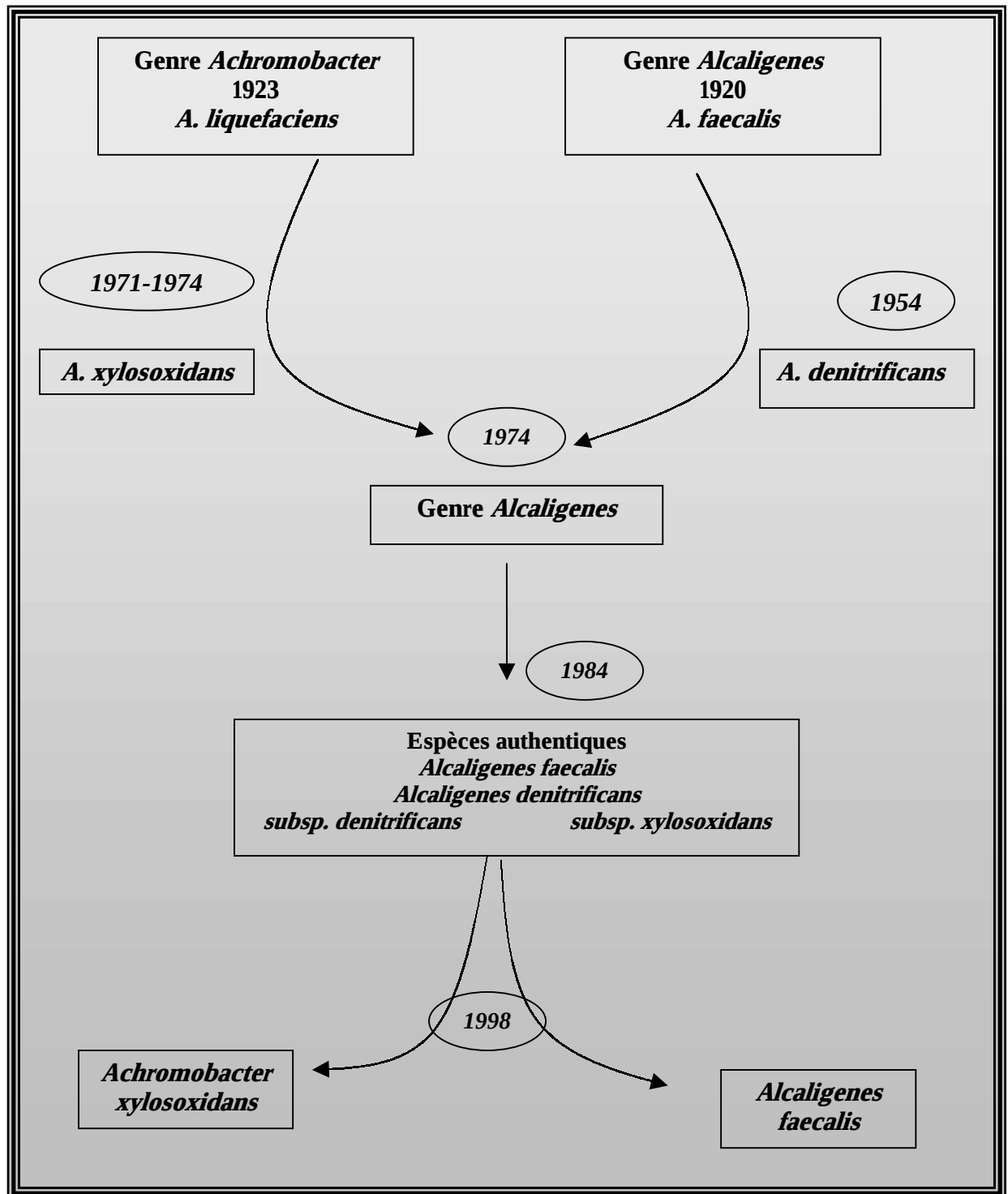


Fig. 2 : Evolution schématique de quelques espèces des genres *Achromobacter* et *Alcaligenes*

II.1 Habitat – Epidémiologie

Achromobacter xylosoxidans présente une répartition écologique semblable aux bactéries du genre *Pseudomonas*. C'est une bactérie ubiquitaire très répandue dans la nature (eau, sol). Elle est aussi présente dans l'environnement hydrique hospitalier et contamine différents types de matériaux médico-chirurgicaux comme les humidificateurs, les respirateurs, des solutés variés comme les savons et les antiseptiques.

C'est une bactérie qui peut coloniser la peau et les muqueuses des cavités naturelles de l'homme et être isolée de la flore normale du tractus intestinal ; un portage cutané a été mis en évidence (Larson, 1981). Elle peut ainsi être transmise au cours des soins aux patients et être à l'origine d'infections, chez des sujets dont les défenses immunitaires sont diminuées par une affection sous-jacente : ce sont des pathogènes opportunistes. Un portage cutané a été mis en évidence.

De nombreux articles relatent l'isolement de la bactérie dans différentes sources de l'environnement hospitalier hydrique :

- équipements respiratoires (humidificateurs, nébulisateurs) (Hugh, 1967 ; Moffret, 1967)
- différents types de solutions :
 - eau distillée, eau désionisée (Moffret, 1967)
 - solutés de perfusion (Grabowitz, 1998)
 - antiseptiques (Vu-Thien, 1998 ; Reverdy, 1984 ; Holmes, 1977)

De véritables épidémies ont été décrites au sein de services hospitaliers, liées à la contamination de matériels médicaux. Le tableau I récapitule les principales épidémies dues à *A. xylosoxidans*.

Contexte clinique	Nombre de patients	Prélèvements positifs	Origine de la souche	Référence
Post-craniotomie	6	LCR	Solution de chlorhexidine	<i>Shigeta, 1978</i>
Variés	15	sang	Solutions salines	<i>Mc Gucking, 1982</i>
Dialyse	/	aspirations trachéales, sang, cathéter, liquides péritonéaux	Eau pour hémodialyse	<i>Reverdy, 1984</i>
Soins intensifs de pneumopathie	/	aspirations trachéales	Humidificateurs, nébulisateurs	<i>Cheron, 1984</i>
Post chirurgie cardiovasculaire	15	sang, cathéter	/	<i>Garhn-Hansen, 1988</i>
Nouveau-nés	/	LCR	Solutés d'éosine	<i>Boukadida, 1993</i>
Neutropénie	11	sang	<i>non retrouvée</i>	<i>Knippschild, 1996</i>
Service pédiatrique des Brûlés	6	sang, plaies	Solution de chlorhexidine	<i>Vu-Thien, 1998</i>
Brûlés	15	Plaies, cathéter veineux central, urine	<i>non retrouvée</i>	<i>Lin, 1997</i>

Tableau I : Epidémies à *Achromobacter xylosoxidans* dans des services hospitaliers (/ = non communiqué)

Achromobacter xylosoxidans est, parmi les bactéries des genres *Achromobacter* et *Alcaligenes*, l'espèce la plus fréquemment rencontrée en clinique. L'explication mise en avant est qu'elle est sélectionnée en raison de sa résistance aux antibiotiques, notamment aux aminosides, aux quinolones, et à la plupart des β -lactamines. *Achromobacter xylosoxidans* est, de plus, résistant aux antiseptiques tels que les ammonium quaternaires et la chlorexhidine (Reverdy, 1984, Shigeta, 1978), largement employés à l'hôpital.

II.2 Pouvoir pathogène

L'augmentation des cas d'immunosuppression, tant pathologiques que thérapeutiques, favorise la colonisation puis l'infection par *Achromobacter xylosoxidans* et le nombre croissant de cas rapportés d'infections et d'isolements cliniques témoigne du rôle de la bactérie en tant que pathogène opportuniste.

Dans tous les cas rapportés, les infections surviennent dans un terrain clinique particulier (sujet immunodéprimé ou fragilisé par une maladie sous-jacente).

La souche de référence décrite par Yabuuchi en 1974 est isolée d'écoulement d'oreille chez des patients atteints d'otites chroniques (Yabuuchi, 1974).

Les infections décrites par la suite sont variées et le plus souvent nosocomiales. On n'observe pas de spécificité clinique, c'est-à-dire que les signes liés à une infection par *A. xylosoxidans* ne diffèrent pas de ceux liés aux autres bacilles à Gram négatif.

Les tableaux IIa, IIb, IIc, IId, répertorient les différentes infections décrites dans la littérature, en fonction :

- du terrain particulier dans lequel se trouvait le patient,
- état clinique du patient
- des prélèvements où le germe a été retrouvé,
- des traitements antibiotiques
- du devenir après traitement antibiotique

Terrain Contexte clinique	Clinique	Prélèvements positifs	Traitement Devenir du patient	Références
Cancer métastatique du sein	Cellulite franche gauche	Collection profonde Eau de boisson	Tobramycine + cotrimoxazole Décédée	<i>Spear, 1988</i>
Cancers	/	sang	/	<i>Legrand, 1992</i>
Hémopathies malignes	bactériémie	sang	/	<i>Hernandez, 1998</i>
Adénocarcinome de la prostate	Infection urinaire	Urine	Carbénicilline <i>Amélioration</i>	<i>Igra-Siegman, 1980</i>
Carcinome métastatique du poumon et du foie Tabac, alcool	Toux productive	Expectorations	Clindamycine Gentamycine Décédée	<i>Igra-Siegman, 1980</i>
Cancer hématologique Tumeur solide	Bactériémie	Sang	/	<i>Martino, 1996</i>
Maladie de Hodgking	Méningite	LCR	Métronidazole Imipénème	<i>Ferri, 1991</i>
Leucémie myéloïde chronique	/	/	Décédé	<i>Mandell, 1987</i>

Tableau IIa : Infections à *Achromobacter xylosoxidans*. (/ = noncommuniqué)

Terrain Contexte clinique	Clinique	Prélèvements positifs	Traitement Devenir du patient	Références
Déficit en IgM Valvulotomie mitrale	Toux productive Dyspnées	Sang expectoration	Carbénicilline Kanamycine <i>Amélioration</i>	<i>Dworjack, 1977</i>
Insuffisance rénale Dialyse péritonéale	Douleurs abdominales	Liquide péritonéal	Cotrimoxazole Intrapéritonéal <i>Amélioration</i>	<i>Morisson, 1986</i>
Insuffisance rénale terminale Dialyse péritonéale	Péritonite associée à une dialyse péritonéale	Liquide péritonéal	Pipéracilline + tazocilline <i>Amélioration</i>	<i>Tang, 2001</i>
Dialyse péritonéale	Péritonite associée à une dialyse péritonéale	Liquide péritonéal	/	<i>El-Shahawy, 1998</i>
Diabète Dialyse péritonéale	Péritonite associée à une dialyse péritonéale	Liquide péritonéal	Carbénicilline <i>Amélioration</i>	<i>Igra-Siegman, 1980</i>
Maladie cardiaque Transplantation hépatique	Fistule duodéale	Sang	Imipénème Tobramycine Vancomycine <i>Amélioration</i>	<i>Dupon, 1993</i>

Tableau IIb : Infections à *Achromobacter xylosoxidans* (/ = noncommuniqué)

Terrain Contexte clinique	Clinique	Prélèvements positifs	Traitement Devenir du patient	Références
HIV	Fièvre	Sang cathéter	Ceftazidime Amikacine <i>Amélioration</i>	<i>Cieslak, 1993</i>
Syndrome d'hyper IgM	Nausée, diarrhée, distension abdominale	Sang	Imipénème Tobramycine <i>Amélioration</i>	<i>Weitkamp, 2000</i>
Pneumonectomie pour aspergillose pulmonaire nécrosante 1 an auparavant	Abcès sous cutané	/	/	<i>Mizunoe, 1998</i>
Nouveau-né (2 jours)	Méningite	LCR sang	Pipéracilline	<i>Bruehl, 1997</i>
Diabète	Otite externe bilatérale	Ecoulement d'oreille	Traitement local (néosporine)	<i>Igra-Siegmán, 1980</i>
Prothèse valvulaire	Abcès	Sang Tractus sinusal suprasternal	Traitement Décédé	<i>Mandell, 1987</i>

Tableau IIc : Infections à *Achromobacter xylosoxidans*. (/ = noncommuniqué)

Terrain Contexte clinique	Clinique	Prélèvements positifs	Traitement Devenir du patient	Références
Porteur de lentilles	Kératite	Cornée	Ticarcilline + ac. clav. Bactrim <i>Amélioration</i>	<i>Lin, 1998</i>
Nouveau-né	Méningite	LCR	Imipénème Cotrimoxazole <i>Amélioration</i>	<i>Pan, 1996</i>
Nouveau- né (transmission foeto-maternelle)	Méningite	LCR (mère avant accouchement) LCR (nouveau-né)	Ticarcilline + ac. clav . Gentamycine Décès du nouveau-né	<i>Hearn, 1990</i>
Nouveau-né	Méningite	LCR Solution d'éosine	/	<i>Ben Salem, 1999</i>
Femme enceinte	Douleurs gorge	gorge	Pas d'antibiothérapie <i>Amélioration</i>	<i>Igra-Siegman, 1980</i>
Blessure au niveau de la poitrine par coup de feu	Méningite	LCR	Nafcillin Cotrimoxazole <i>Amélioration</i>	<i>D'Amato, 1988</i>
Tuberculose	Respiratoire	Pus, sang	Traitement <i>Décédé</i>	<i>Mandell, 1987</i>
Lupus érythémateux disséminé	Arthrite	Sang	/	<i>San Miguel, 1991</i>

Tableau IIId : Infections à *Achromobacter xylosoxidans*. (/ = noncommuniqué)

Outre les affections sous-jacentes citées dans le tableau II, la mucoviscidose constitue depuis quelques années un terrain de prédilection pour la colonisation et les infections broncho-pulmonaires à *A. xylosoxidans*. Le premier article faisant référence à un patient atteint de mucoviscidose date de 1987 (Arroyo, 1987). Ce paragraphe sera développé ultérieurement dans un chapitre consacré à *A. xylosoxidans* et mucoviscidose.

III. Caractères bactériologiques

1. Morphologie

A. xylosoxidans est bacille à Gram négatif (0,5-1 μm) ne formant pas de spore ni de capsule. Des formes filamenteuses peuvent être observées à partir de cultures âgées. L'examen microscopique d'une culture en milieu liquide montre des bacilles très mobiles. La bactérie possède des flagelles de type péritriche (mis en évidence par la coloration de cils au vert de Malachite).

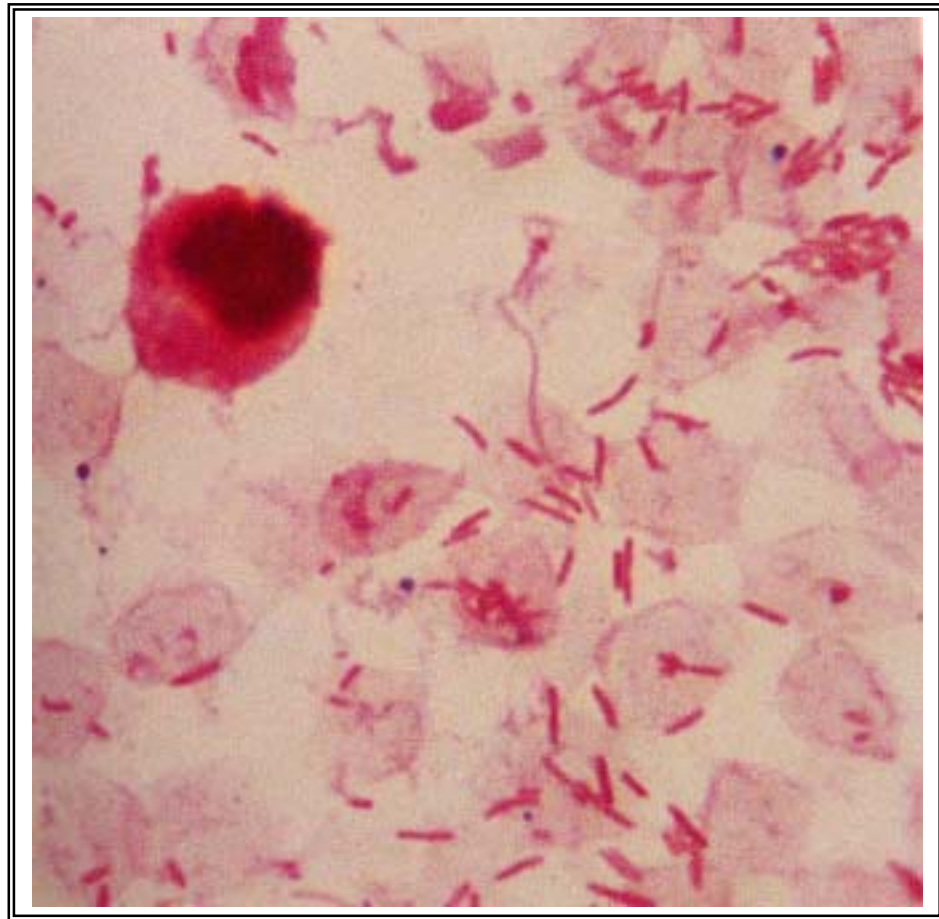


Fig. 3 : *A. xylosoxidans*. Coloration de Gram. (d'après Gestin, Atlas de bactériologie, 1991)

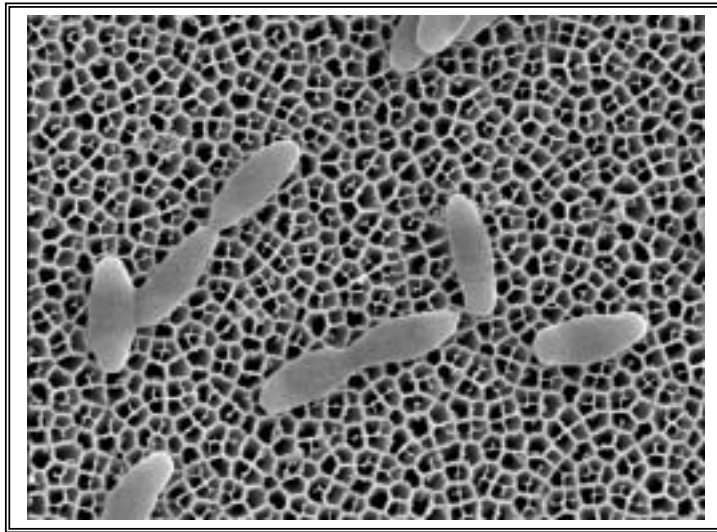


Fig. 4a : vue de *A. xylooxidans* en microscopie électronique à balayage (gross. x 15 000)

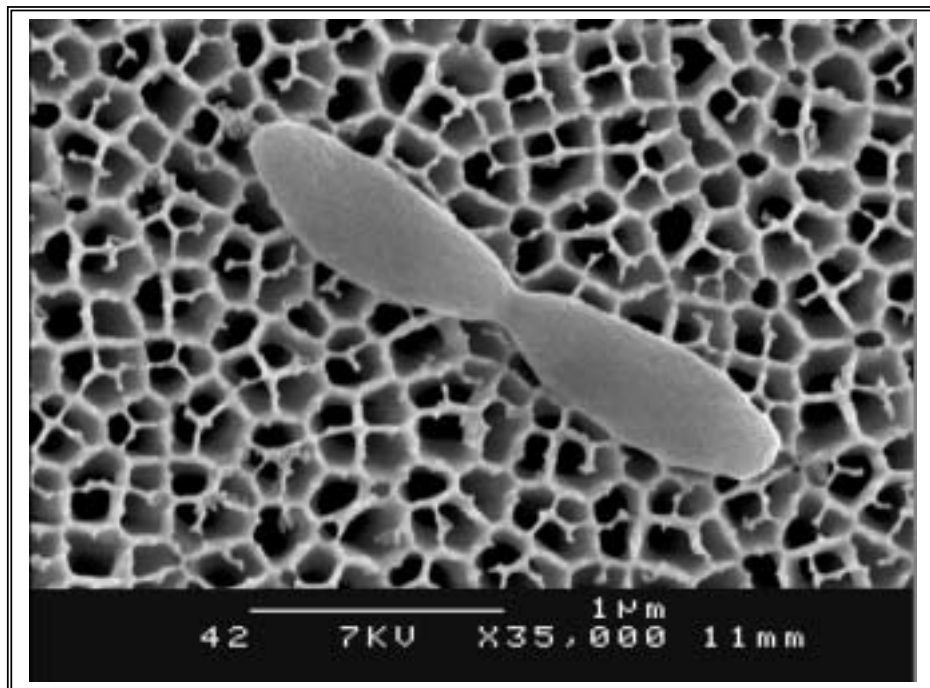


Fig. 4b : vue de *A. xylosoxidans* (en division) en microscopie électronique à balayage (gross. x 35 000)

2. Caractères cultureux

A. xylosoxidans se cultive facilement sur milieux usuels, la température optimale étant comprise entre 30 et 37°C, mais la bactérie pousse à 41°C. La culture n'est abondante sur gélose ordinaire qu'après 48 heures d'incubation sous une atmosphère aérobie. Les colonies sont de petite taille et non pigmentées. Sur milieu cepacia, les colonies sont violettes, proche de celles de *Burkholderia cepacia*. Sous agitation, la culture en milieu liquide (BCC, MH) est abondante en 24 heures. En absence d'agitation un voile est observé en surface (zone d'aérobiose).

Saiman et coll. utilisent, pour confirmer l'identification de 106 souches d' *A. xylosoxidans*, un milieu sélectif nommé oxydative-fermentative polymixin B-bacitracin-lactose (OFPBL), qu'ils incubent à 35°C pendant 18 à 24 heures (Saiman, 2001).

3. Identification

L'identification du germe en routine s'effectue à partir de l'aspect de la colonie, la bactérie à la coloration de Gram, les caractères biochimiques et le phénotype de résistance aux antibiotiques (voir chapitre « sensibilité et résistance aux antibiotiques »).

Achromobacter xylosoxidans est une bactérie oxydase positive, catalase positive, les autres caractères biochimiques étant généralement étudiés à partir de galerie API 20 NE, ou ID 32 GN.

Métabolisme respiratoire : Le bacille est aérobie strict. *A. xylosoxidans* possède une nitrite et une nitrate réductase, ce qui lui permet de respirer en anaérobiose.

Métabolisme azoté : *A. xylosoxidans* se caractérise par un ensemble de caractères négatifs, notamment l'absence d'activité protéolytique (gélatine, caséine), de phénylalanine désaminase, de tryptophane désaminase, d'arginine dihydrolase, de production d'H₂S.

Métabolisme des sucres : *A. xylosoxidans* est un germe non fermentaire, mais capable d'acidifier quelques sucres tels que le D-glucose, le D-xylose, le galactose et le mannose. En revanche, ce pouvoir est nul vis-à-vis du lactose, du saccharose, du fructose, du maltose, du mannitol ou de l'arabinose.

4. Diagnostic différentiel avec les autres bacilles à Gram négatif oxydase positive

Un des premiers caractères discriminants vis-à-vis des autres bacilles à Gram négative oxydase positive est l'acidification du glucose. Cette dernière permet d'exclure certaines espèces comme *Pseudomonas pseudomallei*, *Bordetella bronchiseptica* et toutes les espèces du genre *Alcaligenes*, qui n'acidifient pas le glucose.

La mobilité permet d'exclure le genre *Flavobacterium*, et d'autres caractères biochimiques comme l'ADH (arginine deshydrogénase), la LDC (leucine décarboxylase), la pigmentation, permettent de poser le diagnostic de l'espèce *A. xylosoxidans*.

Le tableau III répertorie les différentes espèces voisines d'*A. xylosoxidans* ainsi que les caractères permettant de les différencier.

	Oxydase	glucose	xylose	urée	H ₂ S	TDA	mobilité	Croissance à 41°C	Autres caractères biochimiques
Acromobacter xylosoxidans	+	+	+	-	-	-	+	+	ADH - LDC -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	ADH +
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	LDC +
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	LDC +
<i>Schewanella</i>	+	+	/	-	+	-	+	-	ODC + pigmentation
<i>Comamonas</i>	+	+	/	-	-	-	+	-	ADH -
<i>Pandoraea sp.</i>	+	/	/	+	-	+	+	-	ADH -
<i>Ochrobacterium anthropi</i>	+	/	/	+	-	+	+	-	ADH -
<i>Flavobacterium sp.</i>	+	V	/	V	-	-	-	-	ADH -
<i>Pseudomonas pseudomalei</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	ADH -
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	ADH - TDA +
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	ADH -

Tableau III : Diagnostic différentiel entre *A. xylosoxidans* et des espèces voisines.
ADH = arginine déshydrogénase ; LDC = leucine décarboxylase ; TDA = tryptophane désaminase ; ODC = ornithine décarboxylase

IV. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

IV.1 Résistances naturelles

A. xylosoxidans est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : les aminosides, les fluoroquinolones de 1^{ère} génération, le chloramphénicol, la rifampicine, la fosfomycine, les tétracyclines, et à de nombreuses β -lactamines, notamment l'amoxicilline, les céphalosporines de 1^{ère} et de deuxième génération, le céfotaxime, la ceftriaxone, l'aztréonam. (Fass, 1996 ; Bizet, 1993 ; Rolston, 1990 ; Mensah, 1989 ; Glupczynski, 1987).

Les souches sont sensibles aux pénicillines à large spectre : carboxypénicillines (ticarcilline) et uréidopénicillines (pipéracilline), à l'imipénème, au latamoxef, et au cotrimoxazole (Mensah, 1989 ; Glupczynski, 1987 ; Rolston, 1990). Vis-à-vis de la ceftazidime, les souches sont sensibles avec des CMI s'échelonnant de 2 à 4 mg/l. De plus, l'acide clavulanique et le tazobactam potentialisent l'activité des pénicillines (Mensah, 1990).

IV.2 Résistances aux bêta-lactamines

La résistance aux β -lactamines chez *A. xylosoxidans* est liée à la production de céphalosporinase de façon constitutive. En 1982 et 1983, Levesque et coll. décrivent trois céphalosporinases constitutives, deux d'origine chromosomiques (PI de 7,4 et 9,3) et une d'origine plasmidique (pI de 8,1). Elles ne sont inhibées ni par l'acide clavulanique, ni par la cloxacilline (Levesque, 1982 ; Levesque, 1983).

En 1985, Fujii caractérise une pénicillinase chromosomique chez 11 souches d'*A. denitrificans subsp. xylosoxydans* isolées de matériel, (Fujii, 1985) :

- de bas poids moléculaire (18 kd) comparé aux autres pénicillinases (20,6 à 46 kd),
- de point isoélectrique élevé (9,8) comparé à ceux des pénicillinases plasmidiques,
- inhibée par l'acide clavulanique,

- de faible affinité pour le sulbactam, l'imipénème, les céphalosporines 7 α -méthoxylées ou céphamycines (céfoxitine, céfotétan, latamoxef)

L'étude de 41 souches en 1989 et de 56 souches en 1990 a permis à Philippon et Mensah de décrire deux phénotypes (Mensah, 1989 ; Mensah, 1990) :

a) un phénotype céphalosporinase, sensible aux pénicillines à large spectre :

- Très résistant au céfuroxime et à la céfoxitine.
- Très sensible aux pénicillines à large spectre (ticarcilline, pipéracilline)
- Synergie entre ac. clav. et pénicillines amoxicilline et ticacilline), tazobactam et pipéracilline, ac. clav. et céftazidime.
- Sensible à la ceftazidime, le moxalactam, l'imipénème.

La haute sensibilité aux pénicillines, la résistance plus élevée au céfuroxime qu'au céfotaxime, la synergie entre l'amoxicilline et l'acide clavulanique, et enfin l'inhibition de la β -lactamase par la cloxacilline suggère que cette céphalosporinase chromosomique est particulière et caractéristique du genre.

Cette enzyme pourrait se rapprocher de la céphalosporinase constitutive chromosomique isolé par l'équipe de Levesque (Levesque, 1982 ; Levesque, 1983).

b) Un phénotype résistant aux pénicillines

L'étude de souches présentant un phénotype résistant aux pénicillines a permis d'individualiser deux pénicillinases (Philippon, 1990):

- Une enzyme hydrolysant l'oxacilline ou OXA

- Hydrolyse importante de l'oxacilline
- Inhibée par les ions chlorures Cl⁻ et l'imipénème.
- PI = 7,5-7,7
- les souches sécrétant cette enzyme :
 - sont résistantes à la ceftazidime.
 - sont moins résistantes aux pénicillines que les souches présentant la pénicillinase type CARB.

- présentent une synergie entre l'ac.clav. et la ticarcilline, la ceftazidime, entre le tazobactam et la pipéracilline.

- Une enzyme hydolysant la carbénicilline ou **CARB**

- inhibée par l'acide clavulanique, mais non par les ions chlorures Cl⁻ ni par l'imipénème.
- PI = 5,7
- présente une hydrolyse élevée de la ticarcilline.
- les souches sécrétant cette enzyme :
 - sont hautement résistantes aux pénicillines.
 - peuvent présenter une synergie entre l'ac.clav. et la ticarcilline, entre le tazobactam et la pipéracilline.
 - ne présentent pas de synergie entre l'acide clav. et la ceftazidime.

Exceptés les β -lactamases, les mécanismes de résistance naturelle n'ont pas été étudiés chez *A. xylosoxidans*, mais on peut supposer qu'interviennent des mécanismes similaires à ceux rencontrés chez *Pseudomonas aeruginosa* : imperméabilité, système d'efflux ...

B. *ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS*

ET

MUCOVISCIDOSE

I. Introduction

La maladie est individualisée et baptisée « Cystic Fibrosis of the Pancreas » en 1938.

La mucoviscidose (ou cystic fibrosis, CF) est la maladie héréditaire létale la plus fréquente dans les populations européennes et nord-américaines. Elle concerne environ une naissance sur 2500. Cette affection, transmise sur le mode autosomique récessif, pour laquelle aucun traitement spécifique n'est aujourd'hui disponible, a une évolution lente mais fatale, consécutive principalement à l'atteinte pulmonaire. La maladie qui touche différents organes, est liée à un dysfonctionnement ubiquitaire des transferts de chlorures épithéliaux.

Le gène responsable de la maladie a été identifié en 1989 sur le bras long du chromosome 7. Il code pour une glycoprotéine membranaire, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Pour 70% des chromosomes mutés, l'anomalie consiste en une délétion de la phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$).

Plus de 900 mutations ont été décrites (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) regroupées en 4 classes selon le type d'altération de la protéine.

3343 cas de malades atteints de mucoviscidose ont été recensés en France en l'an 2000 par « Vaincre la mucoviscidose » et plus de 30000 patients sont suivis aux Etats-Unis.

La médiane de survie de ces patients est passée de 14 en 1969 (premier rapport sur la mortalité des patients atteints de mucoviscidose) à 31 ans en 2000. Les raisons d'un tel progrès sont multiples : diagnostic plus précoce, meilleur contrôle de l'infection bronchique, amélioration du statut nutritionnel, suivi plus étroit des patients, accréditation de centre de soins spécifiques, enseignement auprès des praticiens, recherche intensive. La figure 5 représente l'évolution des médianes de survie de 1940 à 1999.

Médiane de survie

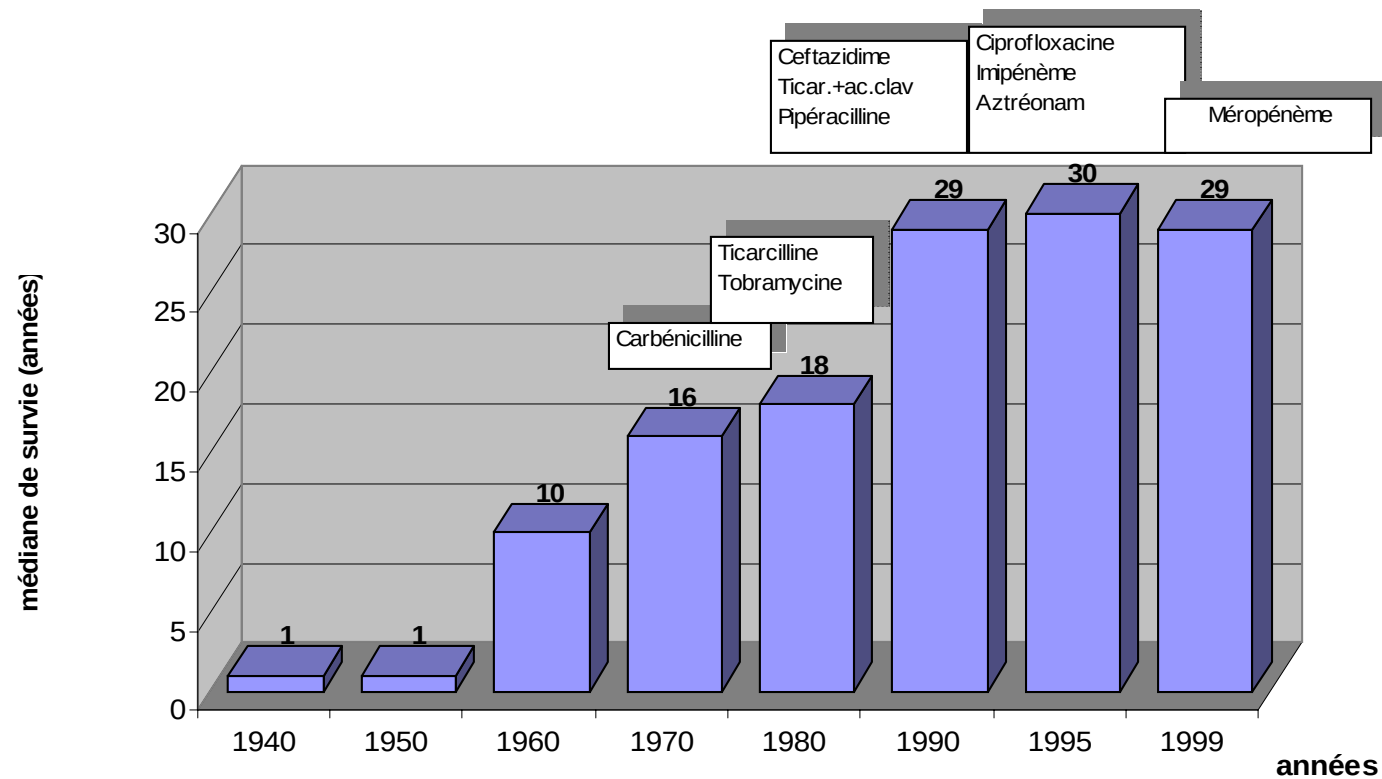


Fig. 5: Médianes de survie des patients atteints de mucoviscidose de 1940 à 1999. Les données proviennent du US CF Foundation National Patient registry. Ont été ajoutés les années approximatives d'apparition des antibiotiques introduits dans les soins des patients mucoviscidosiques (Rajan, 2002).

II. Aspects microbiologiques de la mucoviscidose

II.1 Généralités

L'augmentation de la viscosité des sécrétions bronchiques diminue la clairance mucociliaire et favorise la stagnation des microorganismes. Un article publié dans Cell par l'équipe de Smith explique comment l'activité bactéricide de l'épithélium pulmonaire nécessite une concentration faible de NaCl, et donc comment le poumon du mucoviscidosique est peu apte à se défendre contre l'invasion par des germes (Smith, 1996).

L'évolution de la maladie est alors rythmée par des surinfections bronchiques successives. Certains patients vont rester peu symptomatiques pendant l'enfance, d'autres vont développer une atteinte grave avec insuffisance respiratoire avant l'âge adulte. La sévérité de ces surinfections dépend surtout du microorganisme en cause. D'une manière générale, elles sont initialement associées à des germes commensaux comme *Haemophilus influenzae*, puis *Staphylococcus aureus*, mais c'est l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* qui est en grande partie responsable de la dégradation pulmonaire. Cette dernière est elle-même potentialisée par la présence d'autres bactéries telles que *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans* ou *Stenotrophomonas maltophilia*. Ces surinfections bronchiques répétées conditionnent le pronostic de la maladie. Elles vont engendrer progressivement l'obstruction des petites voies aériennes puis la dilatation des bronches et finalement l'apparition d'une insuffisance respiratoire chronique. On estime actuellement qu'elles sont responsables de 90 % des décès des patients.

II.2 Germes impliqués dans les infections broncho-pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose

- Infections à *Haemophilus influenzae*

Toutes les souches typables ou non d'*Haemophilus influenzae*, sont des bactéries commensales des voies aériennes supérieures. Ces bactéries sont fréquemment retrouvées chez les jeunes enfants, et semblent disparaître à un stade tardif de la maladie lorsque les voies pulmonaires sont colonisées par *Pseudomonas aeruginosa*. Le pouvoir pathogène d'*Haemophilus influenzae* repose essentiellement sur ses propriétés d'adhérence aux cellules de l'arbre respiratoire ainsi que sur son activité protéasique vis-à-vis des immunoglobulines A.

- Infections à *Staphylococcus aureus*

C'est souvent le premier germe pathogène retrouvé au niveau des expectorations bronchiques, et il fut considéré jusqu'en 1950, c'est-à-dire avant l'isolement des premières souches de *Pseudomonas aeruginosa*, comme le principal agent infectieux responsable de mortalité. Il est capable de synthétiser de nombreux facteurs de virulence. Le traitement systématique de l'infection à *S. aureus* pose encore de nombreuses questions, car s'il permet d'éradiquer le germe, on manque de données pour affirmer son rôle bénéfique sur les fonctions respiratoires et l'état clinique du patient. A partir de 18-20 ans, la présence de ce germe non associé à *P. aeruginosa*, est même considérée comme étant d'un très bon pronostic dans l'évolution de la maladie (Huang, 1987). Par ailleurs, le traitement systématique de l'infection à *S. aureus* favoriserait la colonisation à *P. aeruginosa*. Une étude européenne a appréhendé ce risque en suivant pendant 3 ans 639 patients mucoviscidosiques (Ratjen, 2001).

Les souches retrouvées sont le plus souvent sensibles aux antibiotiques.

9,2 % des patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par un SARM (Observatoire National de la Mucoviscidose ; Institut national des études démographiques : bilan 1999), probablement acquis à l'hôpital.

- Infections à *Pseudomonas aeruginosa*

Le premier isolement ou primo-infection à *P. aeruginosa* intervient en moyenne entre l'âge de 8 et 10 ans, parfois dès les premiers mois de vie. 15 à 20 % des enfants de

moins de 2 ans seraient colonisés et cette fréquence augmente avec l'âge. On estime que 80 à 90 % des patients en phase terminale sont contaminés par le germe (Observatoire National de la mucoviscidose). Les raisons de la prévalence élevée du portage de cette bactérie ne sont pas claires. Il n'existe pas de corrélation entre les résultats des prélèvements bactériologiques de l'expectoration et l'évolution clinique : certains patients colonisés demeurent longtemps asymptomatiques, d'autres présentent une détérioration progressive des fonctions respiratoires, dont l'intensité est elle-même très variable d'un sujet à l'autre. Les surinfections bronchiques se différencient du schéma classique d'infection à *P. aeruginosa*. De nombreux facteurs, que l'on ne détaillera pas ici, sont susceptibles d'expliquer les relations singulières entre *P. aeruginosa* et le patient atteint de mucoviscidose. Parmi ceux-ci, on citera les facteurs liés à l'hôte (protéine CFTR, mucines, peptides antibactériens) et les facteurs liés au germe (pili, flagelles, protéine de la membrane externe, exoenzymes, alginate).

Les avis sont partagés parmi les cliniciens sur la nécessité de traiter systématiquement de façon agressive les primocolonisations à *P. aeruginosa*. Pour Hoiby, le traitement des primocolonisations est facile et nécessaire, car la bactéricidie des bactéries planctoniques est plus aisée à obtenir que celle des bactéries englobées dans un biofilm, et les phénomènes inflammatoires qui font suite à la colonisation et à l'infection rendent difficile l'éradication bactérienne. Il appuie son argumentation sur une étude randomisée menée par sa propre équipe, publiée en 1991 dans le Lancet, montrant que le passage à l'infection chronique par le germe est significativement plus faible (14 % contre 58 %) chez les patients traités par l'association ciprofloxacine-colistine (Valerius, 1991). Pour Burns, l'utilisation d'antibiotique en prophylaxie a pour principal écueil la sélection de souches résistantes. Dans une étude menée par sa propre équipe, l'utilisation de la tobramycine inhalée a entraîné, par rapport au placebo, une diminution de 1 à 2 log du nombre de colonies bactériennes, mais aussi une multiplication par quatre des CMI vis-à-vis de l'antibiotique (Burns, 1999).

Depuis la dernière décennie, l'émergence de pathogènes inhabituels, pour la plupart multirésistants, a profondément compliqué la prise en charge thérapeutique dans la mucoviscidose : *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, et *Achromobacter xylosoxidans* sont de plus en plus fréquemment isolés dans le tractus respiratoire des patients mucoviscidosiques avec une prévalence estimée dans la littérature entre 1 et 10 %

(United States CF Foundation, Annual Data Report, 1998), probablement sous-estimée en raison de difficultés d'isolement et d'identification de ces germes (fig.6).

- Infections à bactéries du complexe « cepacia »

Depuis les années 1980, on observe une incidence croissante des colonisations bronchiques à *Burkholderia cepacia* « sensu lato », chez le patient mucoviscidosique. Ce sont des agents pathogènes majeurs dans la mucoviscidose. La sévérité des infections dues à ces bactéries reste variable, allant du simple portage chronique à une pneumonie nécrosante associée à une bactériémie appelé « syndrome cepacia », entraînant le décès en quelques semaines ou quelques mois.

9 génomovars ont été décrits, formant le « complexe cepacia » (Tableau V). Les bactéries du génomovar III ont le plus fort pouvoir de transmission et sont retrouvés le plus fréquemment chez les patients muviscidotiques.

Génomovars de <i>B. cepacia</i>	Espèces identifiées
Génomovar I	<i>B. cepacia</i> « sensu stricto »
Génomovar II	<i>B. multivorans</i>
Génomovar III (groupe A, B)	En cours de dénomination
Génomovar IV	<i>B. stabilis</i>
Génomovar V	<i>B. vietnamiensis</i>
Génomovar VI	En cours de dénomination
Génomovar VII	<i>B. ambifaria</i>
Génomovar VIII	<i>B. anthina</i>
Génomovar IX	<i>B. pyrrocinia</i>

Tableau IV : Nomenclature actuelle des différentes espèces du « complexe cepacia » (Husson, 2002)

- Infections à *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans*

S. maltophilia et *A. xylosoxidans* peuvent coloniser pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Cette colonisation serait associée à une dégradation progressive des fonctions respiratoires. Elle reste cependant moins redoutée que la colonisation à *B. cepacia*, car aucune évolution fatale ne leur est imputée. Leur présence dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose s'explique essentiellement par leur résistance à de nombreux antibiotiques, en particulier aux aminosides (*A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*) et à l'imipénème (*S. maltophilia*). La multiplication des cures intraveineuses d'antibiotiques ou encore l'utilisation d'aérosols d'aminosides favoriseraient la prévalence de ces deux espèces bactériennes chez ces patients (Mooney, 2001 ; Denton, 1996).

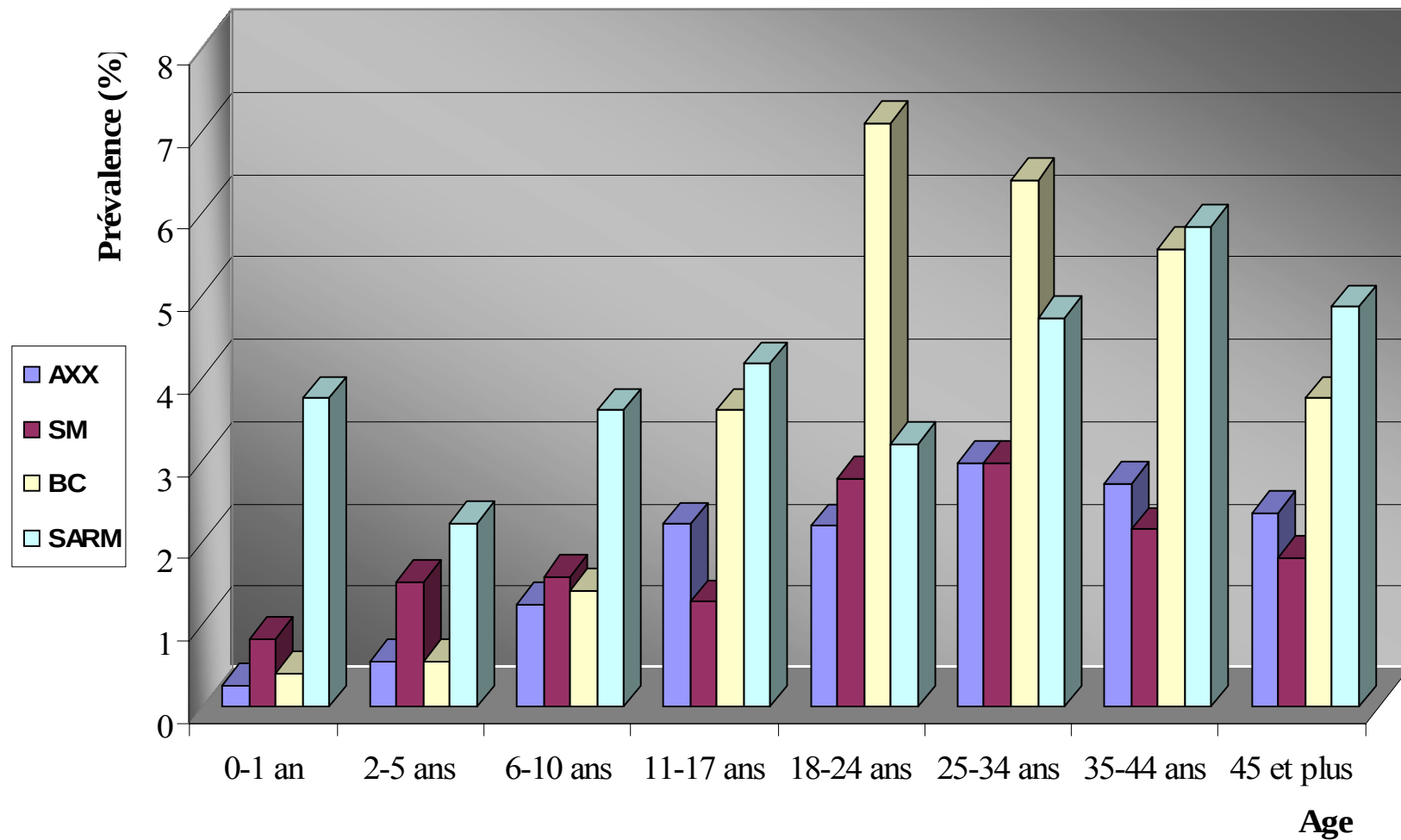


Fig. 6 : Prévalence des bactéries inhabituelles retrouvées chez les patients mucoviscidosiques en fonction de l'âge (Beringer, 2000)

- Autres germes

D'autres bactéries peuvent être retrouvées dans les prélèvements broncho-pulmonaires. Ainsi dans l'étude de Burns en 1998, concernant 595 patients issus de 69 centres, 11,8 % des prélèvements sont positifs à entérobactéries (essentiellement *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*), 3,4 % à *Streptococcus pneumoniae* (Burns, 1998).

II.3 *Achromobacter xylosoxidans*

Bien qu' *A. xylosoxidans* soit un germe qui ne reste que peu isolé en routine, il est retrouvé de plus en plus fréquemment dans les cultures de crachats de patients atteints de mucoviscidose (Moissenet, 1997 ; Vu-Thien, 1996).

Le registre de la fondation de la mucoviscidose des Etats-Unis (The United States Cystic Fibrosis Registry) ne documente aucune culture positive parmi les 11 275 crachats étudiés en 1989, alors qu'en 1996, 1,9 %, en 1997, 2,7 %, et en 1999, 3,8% (701 sur 18 471) des cultures sont positives.

Aucune donnée officielle ne nous renseigne sur la prévalence en France. A Nantes, 6 % des adultes atteints de mucoviscidose sont colonisés par *A. xylosoxidans*.

Le tableau VI représente les différentes études concernant *A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose.

Aucune étude cherchant à identifier la ou les sources d' *A. xylosoxidans* chez les patients atteints de mucoviscidose n'a été publiée. On sait cependant que *A. xylosoxidans* peut coloniser les nébulisateurs et équipements respiratoires (Cheron, 1994 ; Moffret, 1967), qu'il peut se transmettre de personne à personne (Vu-Thien, 1998), bien que ce ne soit pas la principale cause de transmission (Moissenet, 1997 ; Peltroche-Llacsahanga, 1998), et qu'il est retrouvé peu fréquemment dans les domiciles des patients (Mortensen, 1995)

Références	Nombre de patients étudiés (atteints de mucoviscidose)	Nombre de patients colonisés par AXX (% par rapport au nombre total de patients)
<i>Dunne, 1995</i>	/	16
<i>Vu-Thien, 1996</i> <i>Moissonet, 1997</i>	120	8 (6,6 %)
<i>Burns, 1998</i> <i>Burns, 1999</i>	595	52 (8,7 %)
<i>Krzewinski, 2001</i>	520	92 (17,7 %)
<i>Saiman, 2001</i>	69	
<i>Tan, 2002</i>	557	13 (2,3 %)
<i>Saiman, 2002</i>	/	/

Tableau V : Séries de patients atteints de mucoviscidose publiées dans la littérature.

L'utilisation intensive d'antibiotiques augmente la probabilité de colonisation et d'infection par les germes opportunistes et naturellement résistants aux antibiotiques, tels que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* et *Achromobacter xylosoxidans*, ce qui motive l'argument selon laquelle les traitements antibiotiques doivent être instaurés le plus tard possible.

Une étude publiée en 2000, évaluant le pouvoir pro-inflammatoire du LPS (lipopolysaccharide) de 9 bacilles à Gram négatif qui colonisent de façon croissante les patients mucoviscidosiques (*A. xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, 5 espèces de *Ralstonia*, *Bordetella hinzii*), aboutit à la conclusion, qu'excepté *Stenotrophomonas maltophilia*, toutes les espèces étudiées possèdent un pouvoir proinflammatoire suffisant pour représenter une menace pour les patients atteints de mucoviscidose (Hutchison, 2000). Il est pourtant difficile à l'heure actuelle d'apprécier le rôle d'*Achromobacter xylosoxidans* dans l'exacerbation des symptômes chez ces patients. Trois études suggèrent que l'accroissement des signes pulmonaires est associé au germe (Pan, 2000 ; Moissenet, 1997, Dunne, 1995), cependant une partie des patients compris dans ces études étaient colonisés avec *Pseudomonas aeruginosa*. Une étude récente portant sur 11 patients colonisés par *A. xylosoxidans* parmi 557 atteints de mucoviscidose, conclut qu'une infection chronique par le germe ne cause pas de détérioration clinique, mais doit être interprétée avec précaution (Tan, 2002).

II.4 Traitements

Durant les 10 dernières années, l'émergence de tels pathogènes multirésistants a compliqué la prise en charge thérapeutique de patients mucoviscidosiques. A l'heure actuelle, aucun consensus n'a permis d'officialiser un ou des régimes thérapeutiques. Des études *in vitro* et *in vivo* ont néanmoins vu le jour récemment.

1. Etudes in vitro

Dunne et coll., en 1995, effectuent une étude épidémiologique sur 16 patients mucoviscidosiques colonisés par *A. xylosoxidans*. Plus de 85% des souches sont sensibles aux pénicillines à large spectre, à la ceftazidime et au cotrimoxazole ; 75 % sont sensibles à

l'imipénème ; 50% sont sensibles à la ciprofloxacine ; 2 souches sont sensibles à l'amikacine, à la gentamycine et à la tobramycine. Enfin, une souche est résistante à tous les antibiotiques testés (*Dunne*, 1995).

Deux publications de Saiman et coll. en 2001 et 2002, étudient des associations d'antibiotiques sur AXX :

☞ Etude de 2001 :

Sur 106 souches isolées de 78 patients, 12 antibiotiques et 8 associations sont testés, dont les plus actives sont chloramphénicol-minocycline, ciprofloxacine-imipénème et ciprofloxacine-méropénème (*Saiman*, 2001)

☞ Etude de 2002 :

L'azithromycine et la clarithromycine sont testés en association avec d'autres antibiotiques (tobramycine, ciprofloxacine, trovafloxacine, ticarcilline-acide clavulanique, ceftazidime, méropénème, doxycycline, cotrimoxazole), sur 300 espèces multi-résistantes aux antibiotiques (AXX, *Pseudomonas aeruginosa*, SM, BC). L'équipe montre une addition et une modeste synergie envers *Pseudomonas aeruginosa*, mais pas envers AXX (*Saiman*, 2002). L'utilisation des macrolides dans le traitement de patients mucoviscidosiques est prometteur et s'explique par sa capacité d'inhiber les facteurs de virulence de PA et ses propriétés anti-inflammatoires (*Jaffe*, 1998 ; *Labro*, 1998).

Ces études n'ont pas permis de différencier au sein de la population étudiée, les deux phénotypes « sensible » et « résistant » mis en évidence par Mensah, Decré et Philippon (*Decré*, 1995 ; *Decré*, 1992 ; *Mensah*, 1990 ; *Philippon*, 1990).

2. Etude in vivo

Les traitements de patients non mucoviscidosiques atteints d'une infection à AXX sont très variés (cf tableaux 2a-2e). Ils consistent généralement en une pénicilline à large spectre (carbénicilline, ticarcilline, pipéracilline), une céphalosporine (ceftazidime), le cotrimoxazole (Bactrim) ou l'imipénème, associés ou non à un aminoside (gentamycine, kanamycine, tobramycine).

Rares sont les études qui discutent des traitements pour éradiquer *A. xylosoxidans*. La discussion est d'autant plus ardue qu' *A. xylosoxidans* est rarement seul en cause dans les infections broncho-pulmonaires : les traitements sont destinés à éradiquer plusieurs germes. Ainsi dans son étude concernant 120 enfants, Moissenet se limite à citer l'ensemble des antibiotiques utilisés pour éradiquer AXX (co-infectée avec *Pseudomonas aeruginosa*, SM, BC) : Antibiotiques parentéraux (ticarcilline, pipéracilline, ceftazidime ou imipénème) ou oraux (cotirmoxazole ou ciprofloxacine), et aérosols de colistine (Moissenet, 1997).

Les deux principaux écueils d'une antibiothérapie à long terme par voie parentérale ou par voie inhalée sont d'une part l'induction de résistance aux antibiotiques utilisés comme on peut le constater chez *Pseudomonas aeruginosa*, et d'autre part, la sélection de germes naturellement résistants comme *A. xylosoxidans*. Burns et al. étudient chez 520 patients atteints de mucoviscidose l'effet de l'administration intermittente de tobramycine sur la flore bronchique : ils n'observent pas d'augmentation de colonisation par AXX, SM ou BC, mais une résistance accrue de *Pseudomonas aeruginosa* à la tobramycine (Burns, 1999).

Objectifs de l'étude

A. xylosoxidans est un germe multi résistant aux antibiotiques est connue comme le montrent les observations cliniques de la littérature. Cependant, peu d'études portent sur la sensibilité aux antibiotiques de souches d'*Achromobacter xylosoxidans* isolés de patients atteints de mucoviscidose (Saiman, 2001 ; Saiman, 2002 ; Burns, 1995). Aussi, le premier objectif de cette étude est de préciser la sensibilité à différentes classes d'antibiotiques de 16 souches d'*Achromobacter xylosoxidans* isolées de patients mucoviscidosiques à Nantes entre 1998 et 2001.

Par la suite, une étude plus approfondie du comportement de ces souches vis-à-vis des bêta-lactamines permettra une caractérisation des bêta-lactamases. Les données de la littérature, en effet, ont lié initialement la résistance d'*A. xylosoxidans* aux bêta-lactamines à la production de 3 types de céphalosporinases (Levesque, 1982 ; Levesque, 1983). Des pénicillinases ont ensuite été décrites (Fujii, 1985 ; Philippon, 1990).

Une association d'antibiotiques semble être indispensable pour le traitement du germe. Une pénicillinase inhibée par l'imipénème ayant été décrite (Philippon, 1990) et une synergie entre la pipéracilline et l'imipénème observée chez certaines de nos souches, nous ont conduit à comparer l'association pipéracilline-imipénème à d'autres associations.

Pour certains malades, enfin, nous avons isolé des souches d'*A. xylosoxidans* présentant des antibiotypes différentes. Nous avons mis en œuvre une étude génomique sur les 2 antibiotypes d'un même patient afin de savoir s'il s'agissait d'une même souche.

Matériel et méthodes

4. Origine des souches

5. Etudes *in vitro*

- 5.1 Antibiotogramme par diffusion en milieu gélosé
- 5.2 CMI en milieu gélosé
- 5.3 Etudes d'associations
- 5.4 Electrophorèse en isofocalisation
- 5.5 Electrophorèse en champ pulsé

6. Etudes *in vivo*

1. Origine des souches

16 souches isolées de prélèvements cliniques divers chez 11 patients atteints de mucoviscidose entre 1998 et 2001 à l'hôpital Laënnec de Nantes, et une souche de référence ATCC 27061 ont été retenues pour cette étude (tableau VII).

On a étudié sur chacun des 4 patients RB, LC, JMT et MF, 2 souches isolées de 1 à 4 mois d'intervalle.

L'identification des souches a été effectuée par l'étude des caractères morphologiques, culturels et biochimiques, utilisant la galerie API 20 NE. L'attaque du glucose et du xylose ont été recherchées en milieu de Hugh et Leifson, et l'absence de LDC par un disque Eurobio.

2. Etudes *in vitro*

2.1 Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

- Principe :

Cette technique utilisée en routine permet d'apprécier l'activité bactériostatique d'un antibiotique sur une souche bactérienne. Son principe est basé sur l'utilisation de disques imprégnés d'antibiotique, à partir desquels diffuse l'antibiotique selon un gradient logarithmique de concentration décroissante vers la périphérie. Le diamètre est relié à la CMI par une relation du type : diamètre = f (log CMI).

- Protocole :

Pour cette étude nous avons utilisé le panel de 17 antibiotiques sous forme de disque (Biorad®) :

Béta-lactamines (ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline + tazobactam, céfuroxime, céfotaxime, ceftazidime, céfépime, imipénème, aztréonam, témocilline, latamoxef), aminosides (amikacine, tobramycine), ciprofloxacine, colistine, cotrimoxazole.

Le milieu utilisé est celui de Müller Hinton (milieu MH). Ce milieu estensemencé par inondation avec une suspension bactérienne à 10⁶ CFU/ml. Les disques sont déposés à la surface de la gélose, et l'ensemble est incubé 24 heures à 37°C.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et interprétés en « sensible », « intermédiaire » et « résistant », selon les recommandations du CASFM (comité de la société française de microbiologie).

Patients	Année de naissance	Numéro de la souche	Date d'isolement (mois/année)	Nature du prélèvement
RB	1977	1	04 / 00	Aspiration bronchique
		2	05 / 00	Aspiration bronchique
LC	1975	4	10 / 00	Aspiration bronchique
		6	05 / 00	Crachat
JMT	1982	7	04 / 00	Crachat
		8	08 / 00	Hémoculture
MF	1973	9	06 / 01	Lavage broncho-alvéolaire
		10	08 / 01	Aspiration bronchique
IC*	1922	11	01 / 98	Crachat
JMC	1966	12	12 / 98	Crachat
FL	1984	14	10 / 01	Crachat
DR	1980	15	10 / 01	Crachat
RD	1941	16	07 / 01	Aspiration bronchique
LK	1981	18	14 / 01	Crachat
HT	1983	19	04 / 01	Crachat
MN	1979	20	04 / 98	Aspiration bronchique

Tableau VI : Liste des patients intégrés dans l'étude. *IC est un patient présentant une dilatation des bronches et pour qui une forme modérée de mucoviscidose a été suspectée.

D'autre part, pour les souches sensibles, un disque de céfoxitine est déposé à 3 cm d'un disque de pipéracilline.

Enfin, le double test de synergie est aussi réalisé en disposant en croix à 2 cm et à 3 cm du disque d'Augmentin[®], celui de la ticarcilline, de la pipéracilline, de la ceftazidime, du céfotaxime et de l'aztréonam.

2.2 CMI en milieu gélosé

- Principe :

Le comité français de la société française de microbiologie (CASFM) définit la concentration minimale inhibitrice (CMI) comme la plus faible concentration d'une gamme de dilution d'antibiotique selon une progression géométrie de raison deux, qui entraîne une inhibition de toute croissance bactérienne visible.

Elle reste la méthode de référence (*Courvalin*, 1985).

L'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé à des concentrations décroissantes. Ces boîtes sont ensuite ensemencées par les souches bactériennes étudiées. La CMI correspond à la dernière dilution permettant une croissance bactérienne.

- Protocole :

Les CMI de 7 bêta-lactamines (ticarcilline $\pm$ acide clavulanique, pipéracilline (Dakota® Pharm) $\pm$ tazobactam, ceftazidime, imipénème (MSD), méropénème) ont été mesurées vis-à-vis des 16 isolats et de la souche ATCC 27061.

Les antibiotiques et inhibiteurs (acide clavulanique et tazobactam) sont utilisés sous forme de poudre titrée.

La gamme de dilution de chaque antibiotique s'échelonne de 0,125 mg/l à 256 mg/l suivant une progression géométrique de raison 2.

L'ensemencement s'effectue à l'aide d'un appareil de Steers qui délivre 1 μ l d'une suspension 10^7 CFU/ml. La lecture est réalisée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les inhibiteurs de β -lactamases sont incorporés dans le milieu de façon à obtenir une concentration finale de 2 mg/l pour l'acide clavulanique et 4 mg/l pour le tazobactam.

2.3 Etudes des associations

2.3.1 Méthodes en milieu gélosé

Les études d'association ont été effectuées sur toutes les souches résistantes à l'amoxicilline et à la ticarcilline.

- Méthode des disques

Les interactions pipéracilline - imipénème et pipéracilline - méropénème ont été recherchées par la méthode des disques. deux disques de pipéracilline et de carbapénème (imipénème ou méropénème) ont été disposés sur une gélose MH à une distance minimale de 2 cm l'un de l'autre.

- Méthode des bandelettes

Nous avons étudié les interactions pipéracilline-imipénème, pipéracilline-ciprofloxacine et pipéracilline-amikacine à l'aide de disques imprégnés d'antibiotiques disposés en angle droit sur la gélose.

La lecture des interactions a été effectuées après 24 heures d'incubation à 37°C.

2.4 Vitesses de bactéricidie

Principe :

Les vitesses de bactéricidie permettent d'apprécier l'impact bactéricide d'un antibiotique sur un germe *in vitro*, ainsi que la vitesse à laquelle il agit.

Les vitesses de bactéricidie ont été réalisées par la technique de bactéricidie en milieu liquide Mueller Hinton (*Drugon*, 1990).

Protocole :

4 souches parmi les celles de phénotype résistant : 10, 11, 18, 20 ont été sélectionnées pour cette étude.

Les antibiotiques testés ont été choisis en fonction de leur activité sur ces souches et des associations préconisées dans la littérature. Ainsi, nous avons testé la pipéracilline (Dakota[®] Pharm) associée à l'imipénème (MSD), à l'amikacine (Dakota[®] Pharm) et à la ciprofloxacine (Bayer[®]).

Les concentrations retenues pour cette étude sont les concentrations maximales obtenues dans le sérum des malades lors des traitements thérapeutiques. Nous avons étudié la pipéracilline à 256 µg/ml, l'imipénème à 32 µg/ml, l'amikacine à 40 µg/ml et la ciprofloxacine à 4 µg/ml.

Pour chaque souche, une suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml dans du bouillon MH a été mise en présence de chaque concentration d'antibiotique seule ou en association sans oublier un témoin sans antibiotique. Au temps $T = 0, 3, 6$ et 24 heures, les bactéries survivantes sont dénombrées dans chaque tube après dilution et repiquage sur des géloses MH à l'aide d'un ensementeur à spirale (Spiral System – Interscience R).

Les résultats sont exprimés pour un antibiotique ou une association donnée selon une courbe de type $\log(\text{CFU/ml}) = f(\text{temps})$.

2.5 Electrophorèse en isofocalisation

Principe : L'électrofocalisation est une méthode d'analyse et de séparation des protéines basée sur leur différence de charge électrique nette.

Les protéines sont déposées dans un gel contenant des ampholites. En l'absence de champ électrique, le pH à l'intérieur du gel correspond à celui obtenu par le mélange des ampholites. Lorsque le champ électrique est appliqué, les ampholites migrent rapidement vers leur point isoélectrique, créant ainsi un gradient de pH continu dans le gel. Les protéines, plus grosses, vont migrer vers l'anode ou la cathode selon leur charge nette au moment où s'établit le gradient de pH. Au fur et à mesure de leur migration, elles vont traverser des zones de pH modifiant leur charge nette. La migration de la protéine s'arrête à un pH pour lequel la charge nette de la protéine est nulle ; il s'agit du point isoélectrique ou pH_i (Matthew, 1975)

Protocole :

a) Culture bactérienne

Cette étape consiste à obtenir une grande quantité de bactéries en phase de croissance exponentielle, et par voie de conséquence une production maximale de β -lactamase dans le bouillon de culture. Le bouillon BCC a été utilisé pour cette technique. Une préculture d'une souche bactérienne de 20ml de BCC, 8 heures à 37°C sous agitation, est réensemencée dans 400 ml de BCC, puis incubée une nuit à 37°C sous agitation.

b) Extraction enzymatique

Les 400 ml de culture bactérienne sont centrifugés à 4°C pendant 15mn à 8000 tr/mn. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 ml d'eau distillée et le tout homogénéisé. Les bactéries sont ensuite lysées par ultrason (Cell Disruptor B-30 SONIFIER®). Après centrifugation à 4°C pendant 15 mn à 10 000 tr/mn, le surnageant (contenant les β -lactamases) est récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

c) Isoélectrofocalisation

Les extraits sont mis à migrer dans un gel de polyacrylamide jusqu'à immobilisation des enzymes.

Trois β -lactamases ont été utilisées comme marqueur, issues de β -lactamases de point isoélectrique connu : SHV (P453, pI 7,6), PSE-1 (RPL11, pI 5,7) et TEM-1(R111, pI 5,4).

Les β -lactamases sont mis en évidence par apposition, sur le gel de polyacrylamide, d'un gel de révélation renfermant de l'amidon, une solution iodo-iodurée, de la pénicilline G utilisé comme substrat. La β -lactamase coupe le cycle β -lactame en libérant un composé acide qui va réduire l'iode et décolorer le gel de révélation.

Une décoloration du gel correspond donc à une β -lactamase agissant sur le substrat. L'absence de bande correspond soit à l'absence de β -lactamase, soit à l'absence d'une β -lactamase n'agissant pas sur l'antibiotique utilisé comme substrat.

2.6 Electrophorèse en champ pulsé

Principe :

La méthode conventionnelle d'électrophorèse de l'ADN total permet de séparer des fragments dont la taille varie de 100 à 50 000 paires de bases : elle implique l'utilisation d'enzyme à site de coupure fréquents. Cependant la digestion de l'ADN bactérien génère un très grand nombre de bandes inférieures à 50 kb qui, associé à la mauvaise résolution du gel, rend difficile la comparaison d'un grand nombre de souches.

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique permettant d'utiliser des gels d'agarose pour séparer de grands fragments d'ADN. Elle est basée sur l'utilisation de 2 champs électriques d'orientations différentes, appliqués de manière alternative. La différence de direction des champs permet aux molécules de se réorienter, la vitesse de cette réorientation étant liée à leur taille.

L'électrophorèse en champ pulsé impose une méthode d'extraction de l'ADN évitant les forces de cisaillement très importantes de l'extraction en milieu liquide. Afin de conserver l'ADN intact, l'extraction est effectuée par lyse *in situ* des cellules bactériennes dans une matrice d'agarose à faible point de fusion qui, une fois solidifiée, permet la libre circulation des différentes solutions de lyse, de lavage et des enzymes de restriction en 10 ou 20. Les enzymes de restriction sont choisies pour ne couper qu'en 10 ou 20 sites environ, produisant de longs fragments d'ADN de 20 000 à un million de paires de bases.

L'ensemble des fragments, visualisés après coloration du gel par le bromure d'éthidium, représente une empreinte caractéristique (pulsotype) de la souche analysée.

Procédure :

a) Lyse et extraction de l'ADN

- A partir d'une culture fraîche de 12 heures en BCC.
- La suspension bactérienne est agitée toute une nuit puis ajustée à 0,5 McFd.
- Les cellules sont lavées dans 1ml de tampon TEN (Tris-HCl EDTA NaCl) autoclavé, et centrifugées à 8000 trs.mn^{-1} pendant 5 mn.
- Les cellules sont remises en suspension dans 300 μl de tampon EC.
- 300 μl de Sea Plaque agarose à 1% en EC sont ajoutés à la suspension bactérienne.
- La suspension est vortexée brièvement et rapidement pipetée dans un moule d'agarose.
- Les plug sont solidifiés 10 mn à température ambiante puis à 4°C.
- Après solidification, les plug sont placés dans les tubes Falcon coniques vissés de 50 ml contenant 10 ml de tampon EC (+lysozyme) et mis à lyser une heure à 37°C en agitation douce.
- Le tampon EC est ensuite éliminé et remplacé par 10ml de solution ESP, puis le tube est incubé une nuit à 55°C en agitation douce.
- Les plug sont lavés en TE 10-1, 2 fois 1 heure à 55°C puis 6 fois à température ambiante en agitation douce.

- Les plug sont ensuite transférés dans 10ml de TE 10-1 et stockés à 4°C jusqu'à l'analyse.

b) Restriction et électrophorèse

- Les plug sont coupés en fragments 5x5 mm et mis dans 120 µl de tampon contenant 2,5 µl de l'enzyme (Xba I, Spe I, Nod I) et Sma 1 pour le marqueur de taille.
- L'ensemble est incubé 5 heures à 37°C.
- Les fragments de plug sont déposés dans des puits d'un gel de Sea Kem à 1 % en TBE 0,5X. Les puits sont scellés par du Sea plaque agarose 1 % en TBE 0,5X (tampon Tris-Borate EDTA)
- Les conditions d'électrophorèse sont les suivantes :
 - Pulse initial 5 s
 - Pulse final 40 s
 - Temps = 20 heures
 - Voltage : 6 V/cm
 - Température : 14 °C
 - Marqueur de taille : NCTC 8523 (Staphylococcus aureus méthicilline sensible)

c) Analyse des résultats

Les photographies de gel ont été numérisées et analysées à l'aide du logiciel GelCompar 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). Les degrés d'homologie ont été déterminés par la méthode de Dice et l'agrégation des coefficients de corrélation effectuée par la méthode UPGMA (Unweighted pair method arithmetic average).

3. Méthode *in vivo* : l'endocardite expérimentale du lapin

Afin de valider l'interaction pipéracilline-imipénème, il est intéressant de le vérifier dans un modèle d'infection expérimentale.

Le modèle choisi est celui de l'endocardite expérimentale de la valve aortique décrit par Perlman et Freedman (*Perlman*, 1971) modifiée par Durack et Beeson (*Durack*, 1972).

Le modèle animal est le lapin (femelle New Zealand de poids moyen 2,4 +/- 0,2 kg)

1^{er} jour :

- les lapins sont anesthésiés par injection intramusculaire de kétamine (20mg/kg).
- Une cervicotomie sagittale permet une dissection de l'artère carotide. On réalise un abord de l'artère carotide (fig 7.a.)
- On introduit un cathéter en polyéthylène allant jusque dans le ventricule gauche (fig 7.b)
- Le cathéter est ligaturé avec l'artère carotide de façon à rester en place pendant toute la durée de la manipulation (fig. 7.c.)
- Après suture des plans superficiels, le lapin est reposé dans sa cage

2^{ième} jour :

- 24 heures après le cathétérisme, 1ml de suspension bactérienne 10^9 CFU/ml d'une souche d'*A. xylosoxidans* est injectée dans la veine marginale externe de l'oreille. Les végétations provoquées par la mise en place du cathéter sont alors colonisées par les bactéries.

3^{ième} jour :

- Les lapins témoins sont sacrifiés par injection de 2ml de Penthotal (Abbott®) 50 mg/ml dans la veine marginale de l'oreille.
- Les animaux traités sont randomisés en trois régimes thérapeutiques :
 - ☞ Pipéracilline 750 mg/kg/j
 - ☞ Imipénème 100 mg/kg/j
 - ☞ Pipéracilline 750 mg/kg/j + Imipénème 100 mg/kg/j
- Ces doses correspondent chez l'homme à l'administration de 200 mg/kg/J pour la pipéracilline, à 30 mg/kg/J pour l'imipénème.
- La durée du traitement est de 48 heures
- Un cathéter relié à une seringue électrique est mis en place dans une veine marginale de l'oreille et permet d'administrer l'antibiotique .

4^{ème} jour :

- Les animaux traités sont sacrifiés par injection de 2ml de Pentotal (Abbott[®]) 50 mg/ml dans la veine marginale de l'oreille.
- Les végétations intravalvulaires sont prélevées aseptiquement, pesées et disposées dans un potter. Elles sont alors broyées et homogénéisées à l'aide d'un pilon en téflon, en présence de 0,5 ml de sérum physiologique. L'homogénat est alors dilué au 1/100^{ème} et au 1/10.000^{ème} dans du sérum physiologique. On ensemence 50 µl de chaque dilution sur des géloses Tryptocase Soja (TS) à l'aide d'un ensemenceur spiral (Interscience[®])
- La lecture des milieux de culture est réalisée après 48 heures d'incubation à 37°C.
- Le nombre de bactéries survivantes est exprimé en log10 (UFC/mg de végétations). La limite de la méthode est de 1 colonie pour 50µl ensemencés.

Analyse statistique :

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel Staview[®] Software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Pour chaque souche étudiée, une analyse de variance a été réalisée pour comparer les effets entre les différents groupes suivis d'un test de Scheffe. Un $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

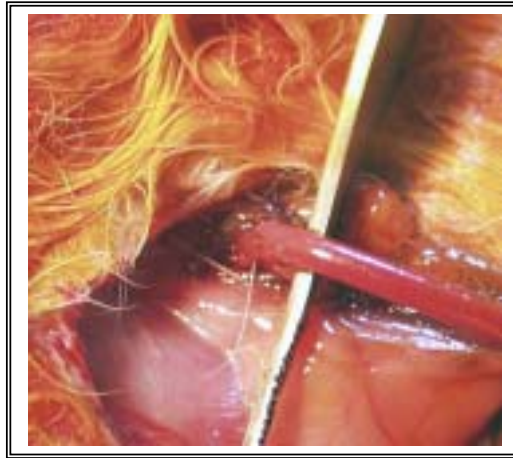


Fig 7a : Endocardite expérimentale de la valve aortique chez le lapin. Extraction de la carotide.



Fig.7b : Endocardite expérimentale de la valve aortique chez le lapin. Le cathéter est introduit jusqu'au ventricule gauche.

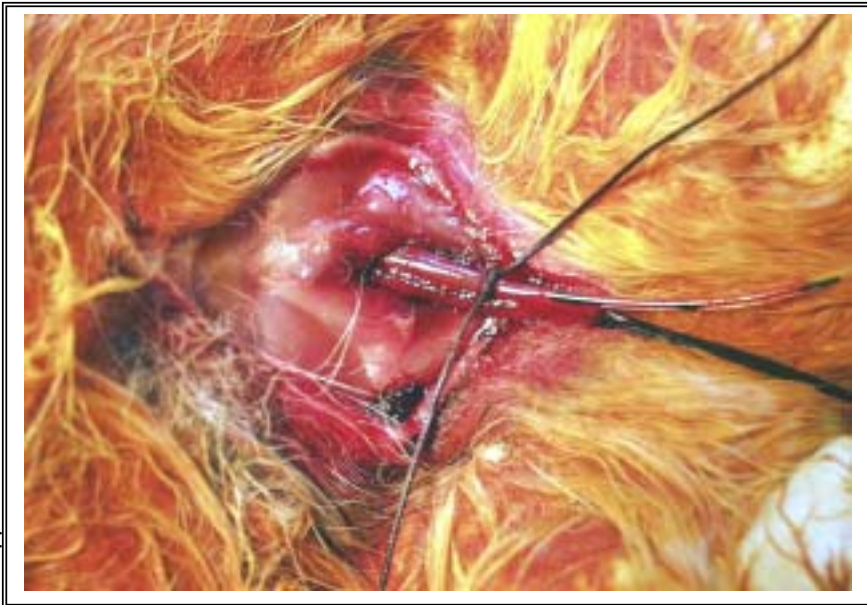


Fig 7c :

re est ligaturée

Résultats

A. Etudes *in vitro*

I. Caractères bactériologiques

II. Sensibilités aux antibiotiques

II.1. Comportement de 16 souches vis-à-vis de 12 β -lactamines

II.2. Détermination des CMI de 7 β -lactamines

III. Associations d'antibiotiques

III.1. Milieu gélosé

III.2. Vitesses de bactéricidie

IV. Détermination des points isoélectriques des β -lactamases

V. Etude génomique

B. Etudes *in vivo*

A. Etudes <i>in vitro</i>

Les 16 isolats cliniques isolés entre 1998 et 2001 et la souche de référence ATCC 27061 ont fait l'objet d'études *in vitro*.

I. Caractères bactériologiques

Les souches d'*A.xylosoxidans* examinées ont présenté des caractéristiques phénotypiques identiques à celles de la souche ATCC 27061, en particulier les caractères suivants : aérobie strict, oxydase +, catalase +, nitrate-réductase +, acidification du glucose et du xylose.

II. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été effectuée par deux techniques : antibiogramme par diffusion en milieu gélosé et détermination des CMI en milieu solide.

II.1. Comportements des 16 souches vis-à-vis de 15 β -lactamines par la technique de diffusion en milieu gélosé

Dans les tableaux VIIa et VIIb sont reportés les diamètres obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour les 16 isolats cliniques et pour la souche ATCC 27061, ainsi que les interprétations qui en découlent selon les recommandations de la CASFM. Les antibiogrammes des souches ATCC 27061, 9 et 10 sont illustrés par les figures 9a, 9b et 9c.

Tous les isolats cliniques et l'ATCC 27061 présentent une résistance élevée à certaines β -lactamines (céfuroxime, céfotaxime, céfépime, aztréonam, témocilline, latamoxef). Le comportement des 16 souches vis-à-vis des 15 β -lactamines a permis de distinguer 2 phénotypes distincts :

☞ Un phénotype sensible aux pénicillines.

Ce phénotype concerne 8 souches (4, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 19) en plus de l'ATCC 27061.

La souche présente une grande sensibilité aux aminopénicillines ($22,4 \pm 1,8$ mm), aux pénicillines à large spectre (ticarcilline ($31,6 \pm 7$ mm), pipéracilline ($32,1 \pm 5,2$ mm), à l'imipénème ($27 \pm 4,3$ mm) et au méropénème ($23 \pm 3,5$ mm). La ceftazidime ($15,6 \pm 5,3$ mm) est peu active. La témocilline ($10,6 \pm 6,7$ mm), l'aztréonam (6mm) et le latamoxef (6mm) ne sont pas actives.

On n'observe pas de synergie entre les pénicillines et les inhibiteurs de β -lactamases :

- $20,4 \pm 6,2$ mm pour l'amoxicilline contre $22,1 \pm 1,9$ mm pour l'association amoxicilline-ac.clav.
- $31,6 \pm 7$ mm pour la ticarcilline contre $29,7 \pm 5,5$ mm pour l'association ticarcilline-ac.clav.
- $32,1 \pm 5,2$ mm pour la pipéracilline contre $31,8 \pm 5,7$ mm pour l'association pipéracilline-tazobactam

Le double test de synergie ne met pas en évidence de bêta-lactamase à spectre élargi.

Enfin, ces souches présentent un antagonisme entre la céfoxitine et la pipéracilline, évoquant un phénotype de céphalosporinase inductible (fig.8)

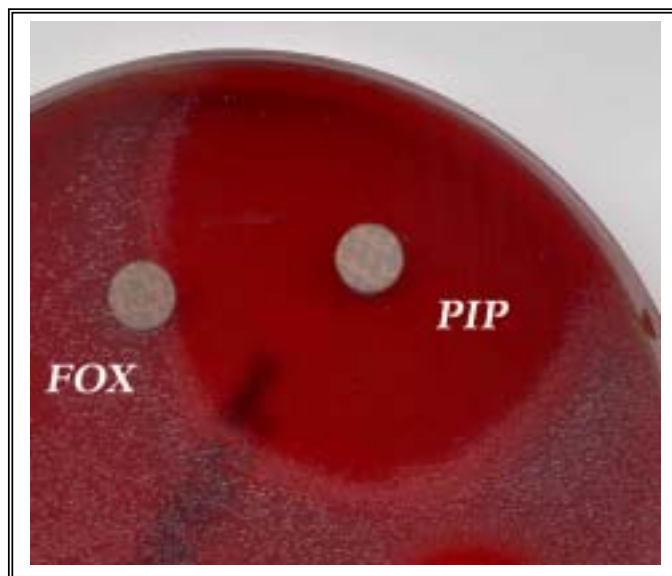


Fig. 8 : Test d'antagonisme entre la pipéracilline par la céfoxitine sur la souche 6. La diminution du diamètre de la zone d'inhibition de la pipéracilline au contact de la céfoxitine est évocatrice d'une céphalosporinase inducible.

☞ **Un phénotype résistant aux pénicillines**

Ce phénotype concerne 8 souches (1, 2, 8, 10, 11, 14, 18, 20).

Il est caractérisé par la résistance à l'amoxicilline (6mm) et l'amoxicilline + ac. clav. (6mm), à la ticarcilline ($7,7 \pm 3,6$ mm), à la pipéracilline.

On n'observe pas de synergie entre les pénicillines à large spectre et les inhibiteurs de β -lactamases, mais au contraire, pour certaines souches, une légère baisse du diamètre d'inhibition avec l'association pipéracilline-tazobactam comparée à la pipéracilline seule (souche 1, 2, 10, 18).

Le diamètre moyen de la ceftazidime est de $6,9 \pm 2,5$ mm

Les diamètres de l'imipénème ($21,5 \pm 7,7$ mm) et du méropénème ($9,1 \pm 8,8$ mm) sont diminués par rapport à ceux du phénotype sensible. Cependant la souche 1 présente un diamètre autour du méropénème de 31 mm.

Ces antibiogrammes ont permis d'observer, pour les souches 1, 3, 9, 10 et 18, une synergie entre la pipéracilline et l'imipénème (voir paragraphe IV. Associations d'antibiotiques)

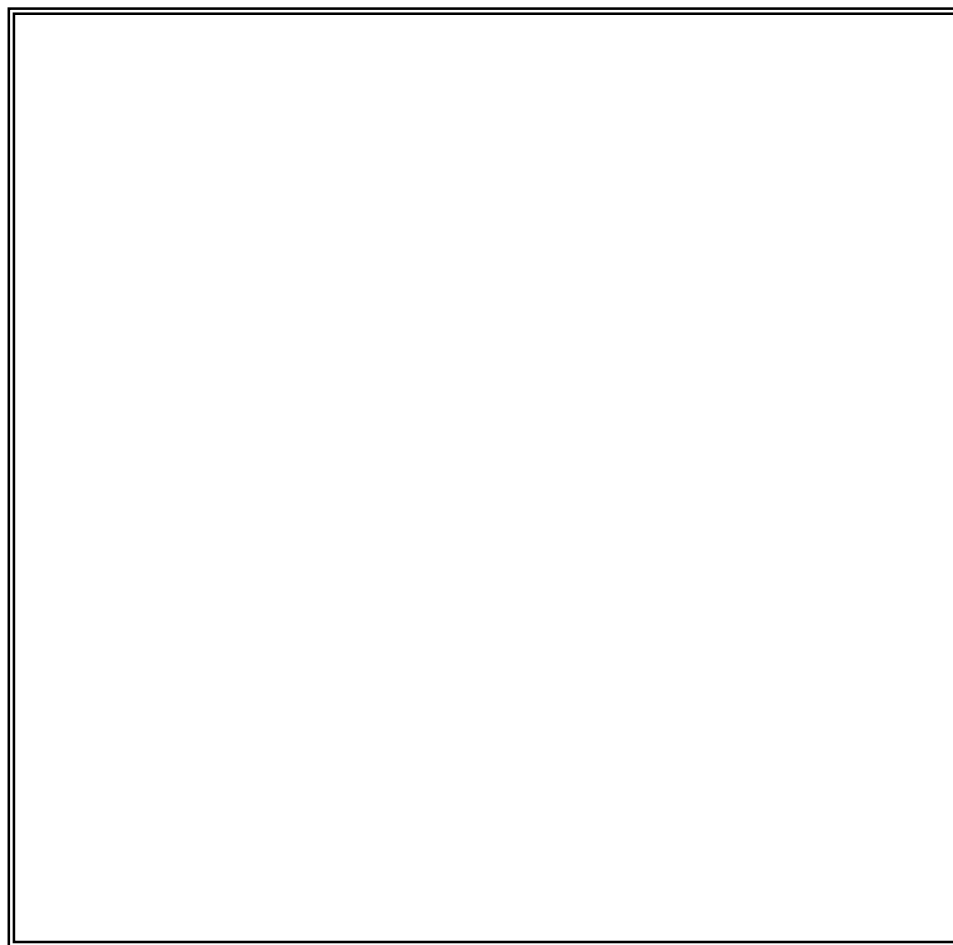
		Phénotype « sensible »																		Moyenne des diamètres ± écart-type (mm)	S/I/R	
		ATCC 27061		4		6		7		9		12		15		16		19				
		Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R			
Béta-lactamines	AMX	21	S	21	S	21	S	21	S	21	S	21	S	24	S	23	S	26	S	21,7 ± 1,2	S	AMX
	AMC	21	S	21	S	21	S	22	S	22	S	21	S	24	S	21	S	26	S	21,5 ± 1,1	S	AMC
	TIC	37	S	35	S	38	S	23	S	23	S	23	S	25	S	37	S	32	S	31,6±7	S	TIC
	TCC	30	S	33	S	34	S	23	S	23	S	23	S	25	S	30	S	32	S	29,7±5,0	S	TCC
	PIP	40	S	36	S	33	S	36	S	36	S	27	S	25	S	40	S	28	S	32,1±5,2	S	PIP
	TZP	40	S	38	S	37	S	31	S	31	S	27	S	25	S	40	S	28	S	31,8±5,7	S	TZP
	ATM	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	8	R	6,5±1,4	R	ATM
	TEM	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	16	I	6	R	8	R	8,2±3,7	R	TEM
	IPM	28	S	29	S	29	S	31	S	31	S	24	S	22	S	30	S	21	S	27,1±4,1	S	IPM
	MEM	26	S	24	S	23	S	17	I	17	I	20	S	23	S	25	S	23	S	21,5±3,1	S	MEM
	CXM	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	CXM
	CTX	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	CTX
	CAZ	9	R	16	I	20	I	6	R	6	R	19	I	19	I	16	I	20	I	15,2±5,9	I	CAZ
	FEP	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R	6,7±1,5	R	FEP
	MOX	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	9	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	MOX
	TM	6	R	9	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	TM
	AN	6	R	23	S	13	R	16	I	16	I	6	R	6	R	6	R	6	R	11,5±6,5	R	AN
	FOS	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	FOS
	CS	17	S	11	S	11	R	19	R	19	S	15	S	15	S	17	S	16	S	15,3±3,1	I	CS
	CIP	19	I	18	R	21	I	21	I	21	I	19	I	19	I	19	I	13	R	18,8±2,6	R	CIP
	SXT	6	R	17	S	28	S	20	S	20	S	6	R	6	R	6	R	6	R	13,6±8,7	I	SXT

Tableau VII a : Sensibilité des 16 souches à 21 antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé - Ø = diamètre de zone d'inhibition en mm ; S=sensible, I=intermédiaire, R=résistant.

		Phénotype « résistant »																			
		1		2		8		10		11		14		18		20		Moyenne des diamètres ± écart-type (mm)	S/I/R		
		Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R	Ø	S/I/R				
Béta-lactamines	AMX	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	AMX	
	AMC	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	AMC	
	TIC	6	R	16	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	7,7±3,6	R	TIC	
	TCC	6	R	9	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	TCC	
	PIP	17	I	17	I	6	R	15	R	17	R	17	I	13	R	12	R	14,2±3,9	I	PIP	
	TZP	17	I	17	I	6	R	13	R	18	R	17	I	6	R	6	R	12,5±5,6	R	TZP	
	ATM	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	ATM	
	TEM	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	TEM	
	IPM	28	S	28	S	21	I	16	R	18	I	19	I	29	S	6	R	21,5±7,7	I	IPM	
	MEM	31	S	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	9,1±8,8	R	MEM	
	CXM	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	CXM	
	CTX	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	CTX	
	CAZ	6	R	6	R	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	6,9±2,5	R	CAZ	
	FEP	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	7,0±2,8	R	FEP	
MOX	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6,5±1,4	R	MOX		
TOB		6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	TM	
AN		25	S	24	S	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	11,6±8,4	R	AN	
FOS		6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6,0	R	FOS	
CS		12	R	11	R	13	R	6	R	19	S	6	R	6	R	34	S	13,4±9,5	R	CS	
CIP		17	R	10	R	21	I	8	R	19	I	9	R	17	R	11	R	14,0±5,0	R	CIP	

<i>SXT</i>	6	R	6	R	6	R	6	R	31	S	18	S	6	R	6	R	10,6±9,2	I	<i>SXT</i>
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---	----	---	---	---	---	---	----------	---	-------------------

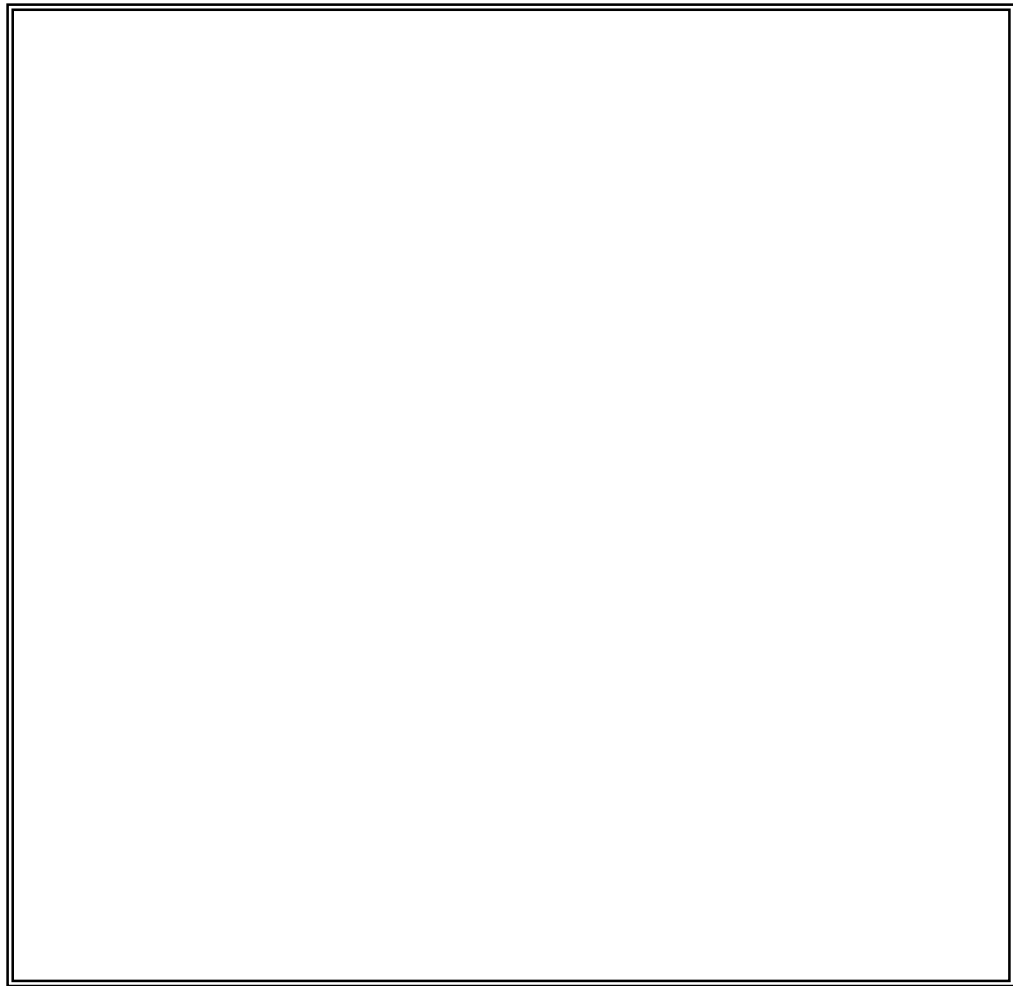
Tableau VII b : Sensibilité des 16 souches à 21 antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé - Ø = diamètre de zone d'inhibition en mm ; S=sensible, I=intermédiaire, R=résistant.



Liste des abréviations :

AN = amikacine, *ATM* = aztréonam, *CAZ* = ceftazidime, *CS* = colistine, *CTX* = céfotaxime, *CXM* = céfuroxime, *FEP* = céfépime, *FOS* = fosfomycine, *IPM* = imipénème, *MOX* = latamoxef, *PIP* = pipéracilline, *STX* = cotrimoxazole, *TCC* = ticarcilline + Ac. clav., *TEM* = témocilline, *TIC* = ticarcilline, *TM* = tobramycine, *TZP* = pipéracilline + tazobactam.

**Fig. 9a : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.
Souche ATCC 27061**



Liste des abréviations :

AN = amikacine, *ATM* = aztréonam, *CAZ* = ceftazidime, *CS* = colistine, *CTX* = céfotaxime, *CXM* = céfuroxime, *FEP* = céfépime, *FOS* = fosfomycine, *IPM* = imipénème, *MOX* = latamoxef, *PIP* = pipéracilline, *STX* = cotrimoxazole, *TCC* = ticarcilline + Ac. clav., *TEM* = témocilline, *TIC* = ticarcilline, *TM* = tobramycine, *TZP* = pipéracilline + tazobactam

Fig. 9b : Antibiotogramme par diffusion en milieu gélosé.
Souche n°9



Liste des abréviations :

AN = amikacine, *ATM* = aztréonam, *CAZ* = ceftazidime, *CS* = colistine, *CTX* = céfotaxime, *CXM* = céfuroxime, *FEP* = céfépime, *FOS* = fosfomycine, *IPM* = imipénème, *MOX* = latamoxef, *PIP* = pipéracilline, *STX* = cotrimoxazole, *TCC* = ticarcilline + Ac. clav., *TEM* = témocilline, *TIC* = ticarcilline, *TM* = tobramycine, *TZP* = pipéracilline + tazobactam,

Fig. 9c : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.
Souche n°10

II.2. Autres antibiotiques (antibiogramme par diffusion en milieu gélosé)

Seules 4 souches (1, 2, 4, 9) sont sensibles amikacine ($25,5 \pm 2,6$ mm) ; toutes les autres sont résistantes à l'amikacine ($8,1 \pm 3,8$ mm) et à la tobramycine (6mm).

Toutes les souches présentent une résistance à la ciprofloxacine ($16,4 \pm 4,6$ mm), une haute résistance à la fosfomycine (6mm).

La colistine et le cotrimoxazole sont inconstamment sensibles :

- 8 souches sensibles (7, 11, 12, 15, 16, 19, 20) ($19 \pm 6,2$ mm) et 8 souches résistantes (1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 14, 18) ($9,1 \pm 3,0$ mm) pour la colistine
- 6 souches sensibles (2, 4, 6, 7, 11, 14) ($21,8 \pm 6,1$ mm) et 10 souches résistantes (1, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 20) (6mm) pour le cotrimoxazole.

III. Détermination des CMI de 7 β -lactamines vis-à-vis des 16 isolats

Les CMI de 7 β -lactamines : ticarcilline (TIC), ticarcilline + acide clavulanique (TCC), pipéracilline (PIP), pipéracilline+ taobactam (TZP), cefatzidime (CAZ), imipénème (IMP) et méropénème (MEM) ont permis de confirmer l'existence de 2 phénotypes, sensible et résistant (tableau IX).

☞ **Phénotype sensible**

Les valeurs des CMI pour les 9 souches sensibles et la souche de référence sont comprises entre 0,125 et 8 mg/l pour la ticarcilline et la pipéracilline. On n'observe pas de synergie entre les pénicillines et les inhibiteurs des β -lactamases (TCC, TZP).

Les valeurs des CMI pour la ceftazidime sont comprises entre 8 et 256 mg/l : *A. xylosoxidans* n'est pas sensible à cet antibiotique.

Toutes les souches appartenant à ce phénotype sont sensibles à l'imipénème (CMI de 0,125 à 2) et au méropénème (0,125 à 4).

Phénotype résistant

Les valeurs des CMI pour les pénicillines sont significativement plus élevées : 64 à 256 pour la ticarcilline avec et sans acide clavulanique, 16 à 256 pour la pipéracilline avec et sans tazobactam. On n'observe pas de synergie entre les pénicillines et les inhibiteurs des β -lactamases (TCC, TZP).

Les valeurs des CMI pour la ceftazidime sont comprises entre 16 et 256 mg/l. Celles pour l'imipénème et le méropénème sont significativement plus élevées : 4 à 32 pour les 2 antibiotiques.

		TIC	TCC	PIP	TZP	CAZ	IPM	MEM
Phénotype sensible	ATCC 27061	2	2	0,5	0,5	8	2	1,5
	4	2	2	< 0,25	< 0,25	16	2	1,5
	6	4	8	< 0,25	< 0,25	8	1	0,5
	7	16	16	8	8	128	2	4
	9	4	2	1,5	2	> 256	2	< 0,25
	12	4	2	1	1	8	1	0,5
	15	0,5	0,25	0,25	0,25	2	1,5	< 0,25
	16	2	2	0,5	0,5	8	2	1,5
	19	1	1	0,5	0,5	2	2	0,5
Phénotype résistant	1	128	128	32	16	> 256	8	0,125
	2	> 256	> 256	64	32	> 256	4	16
	8	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	8	> 32
	10	64	128	128	128	> 256	16	32
	11	> 256	128	64	32	16	8	16
	14	> 256	> 256	128	128	128	8	32
	18	> 256	> 256	128	128	> 256	4	16
	20	128	128	> 256	> 256	> 256	> 32	> 32

Tableau VIII : Valeurs des CMI (mg/l) de 7 bêta-lactamines vis-à-vis des 16 isolats cliniques et de la souche de référence ATCC 27061

IV. Associations d'antibiotiques

IV. 1 Milieu gélosé

Méthode des disques :

Une synergie a été observée certaines souches 1, 2, 9, 10, 14, 18, 20, entre la pipéracilline et les 2 carbapénèmes utilisés : l'imipénème et le méropénème (fig. 10a, 10b)

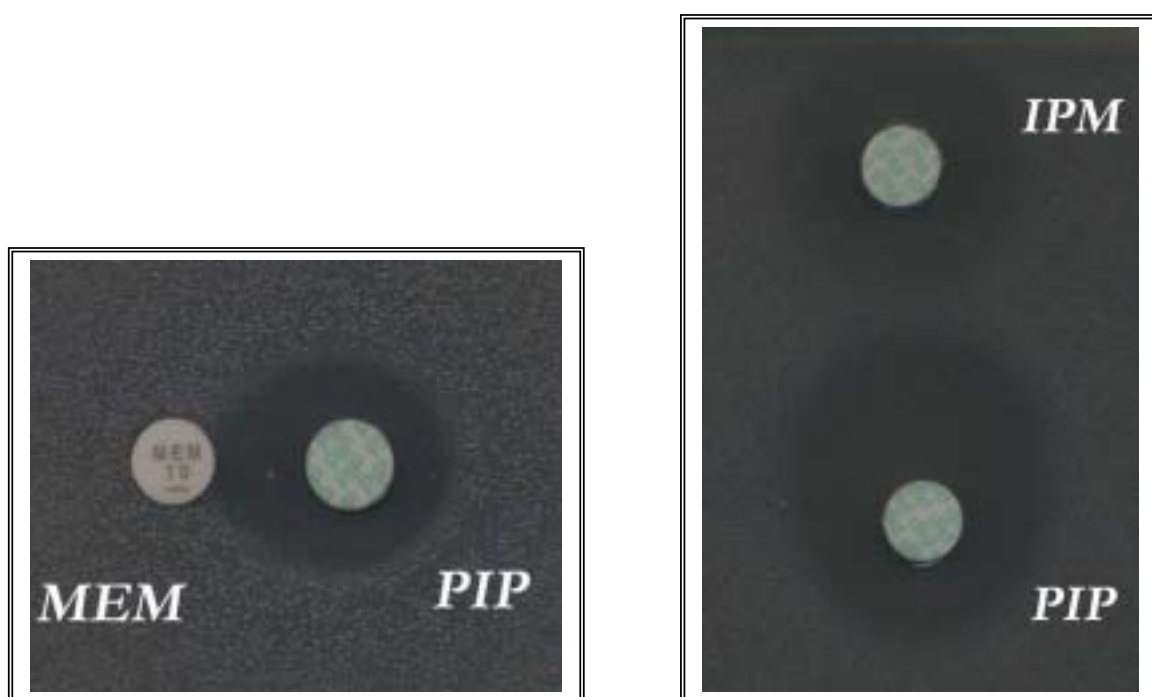


Fig. 10a : Tests de synergie effectué sur la souche 10 par la méthode des disques. Association PIP-IPM et PIP-MEM. On observe une nette augmentation de la zone d'inhibition entre les 2 disques.

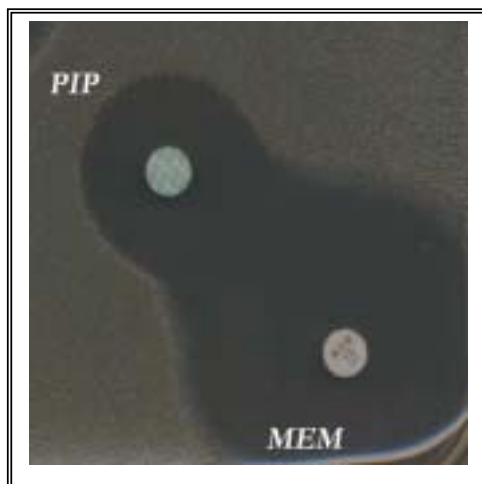


Fig. 10b : Tests de synergie effectués sur la souche 9 par la méthode des disques. Association PIP-IPM et PIP-MEM. On observe une nette augmentation de la zone d'inhibition entre les 2 disques.

Méthode des bandelettes :

Cette méthode a permis de confirmer les résultats obtenus par la méthode des disques : les souches 1, 2, 9, 10, 14, 18, 20 présentent une synergie pipéracilline-imipénème (fig. 11 et 12).

La souche 11, en revanche ne donne pas lieu à une synergie entre la pipéracilline et l'imipénème, mais entre la pipéracilline et l'amikacine (Fig. 13).

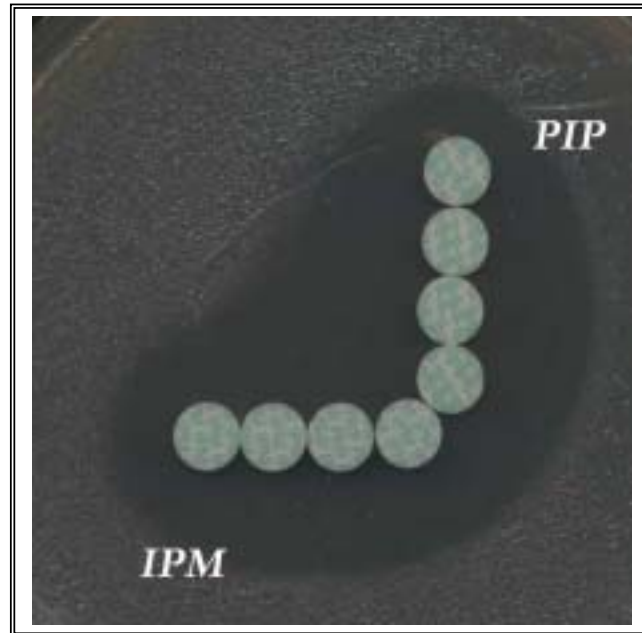


Fig. 11 : Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 10. La pipéracilline et l'imipénème agissent en synergie.

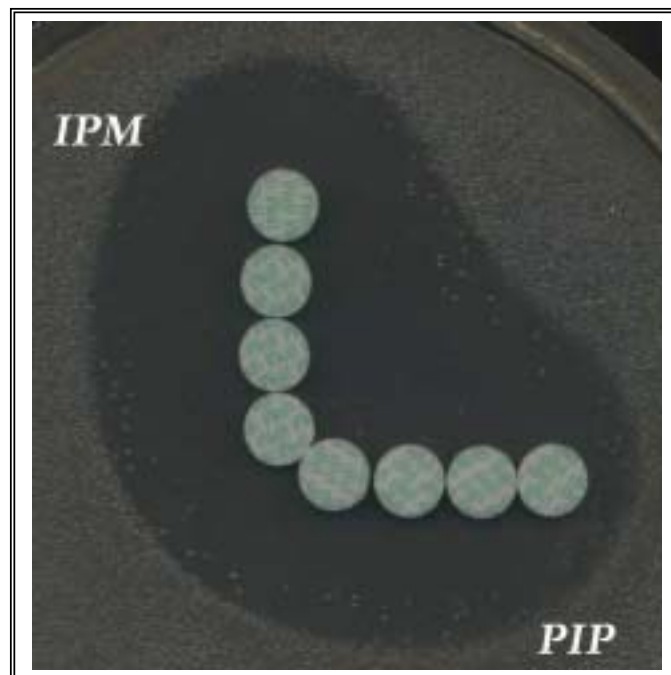


Fig. 12 : Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 18. La pipéracilline et l'imipénème agissent en synergie.

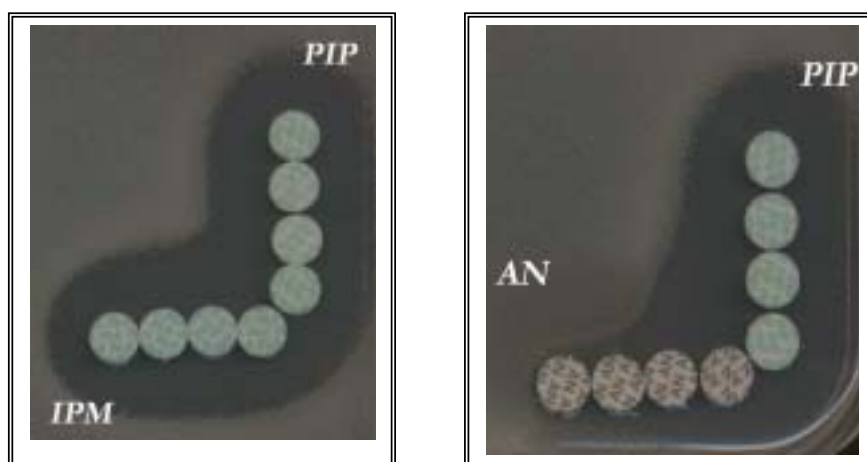


Fig. 13 : Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 11. La pipéracilline et l'imipénème agissent de manière indifférente, et la pipéracilline et l'amikacine en synergie.

IV. 2. Vitesses de bactéricidie

L'étude des vitesses de bactéricidie effectuées sur 4 souches appartenant au phénotype « résistant » (10, 11, 18, 20) sont représentés sur les figures 14a, 14b, 14c et 14d.

Une différence d'action entre 2 antibiotiques et/ou associations est considérée comme significative si elle est supérieure ou égale à 2 log.

Sur les 4 souches, la pipéracilline utilisée seule ne présente aucune activité bactérienne. La ciprofloxacine et l'amikacine seules ne sont pas non plus actives sur les souches 10, 18, 20.

Amikacine et ciprofloxacine

Sur la souche 11, l'amikacine présente une faible activité bactéricide en 6 heures avec une diminution du nombre de bactéries de 2 log₁₀. Mais de 6 à 24 heures, on observe une recroissance bactérienne. La ciprofloxacine est peu bactéricide en 6 heures avec une diminution inférieure à 2 log₁₀. Cette bactéricidie se poursuit avec un abaissement du compte bactérien de 3 log₁₀ en 24 heures.

Imipénème

Sur les souches 10 et 20 (intermédiaire et résistante à l'imipénème), l'activité de cet antibiotique utilisé seul est faible en 6 heures avec une diminution maximale du nombre de bactérie de 1 log₁₀. Mais elle est plus importante en 24 heures avec une diminution de 2 à 3 log₁₀.

Cependant, sur la souche 18, sensible à l'imipénème, on note une activité bactéricide plus intense en 6 heures (diminution de 2 log₁₀ en 6 heures et de 4 log₁₀ en 24 heures).

Associations pipéracilline-ciprofloxacine et pipéracilline-amikacine

Les associations pipéracilline-ciprofloxacine et pipéracilline-amikacine sont inefficaces sur les souches 10, 18, 20 qui sont résistantes à ces antibiotiques.

Sur la souche 11, sensible à l'amikacine, et intermédiaire à la ciprofloxacine, on observe une bactéricidie en 24 heures pour les associations pipéracilline-amikacine et pipéracilline-ciprofloxacine avec une diminution d'environ 3 log₁₀.

Association pipéracilline-imipénème

L'association pipéracilline-imipénème est bactéricide en 24 heures sur les 4 souches, mais ne présente aucune augmentation d'activité par rapport à l'imipénème seul.

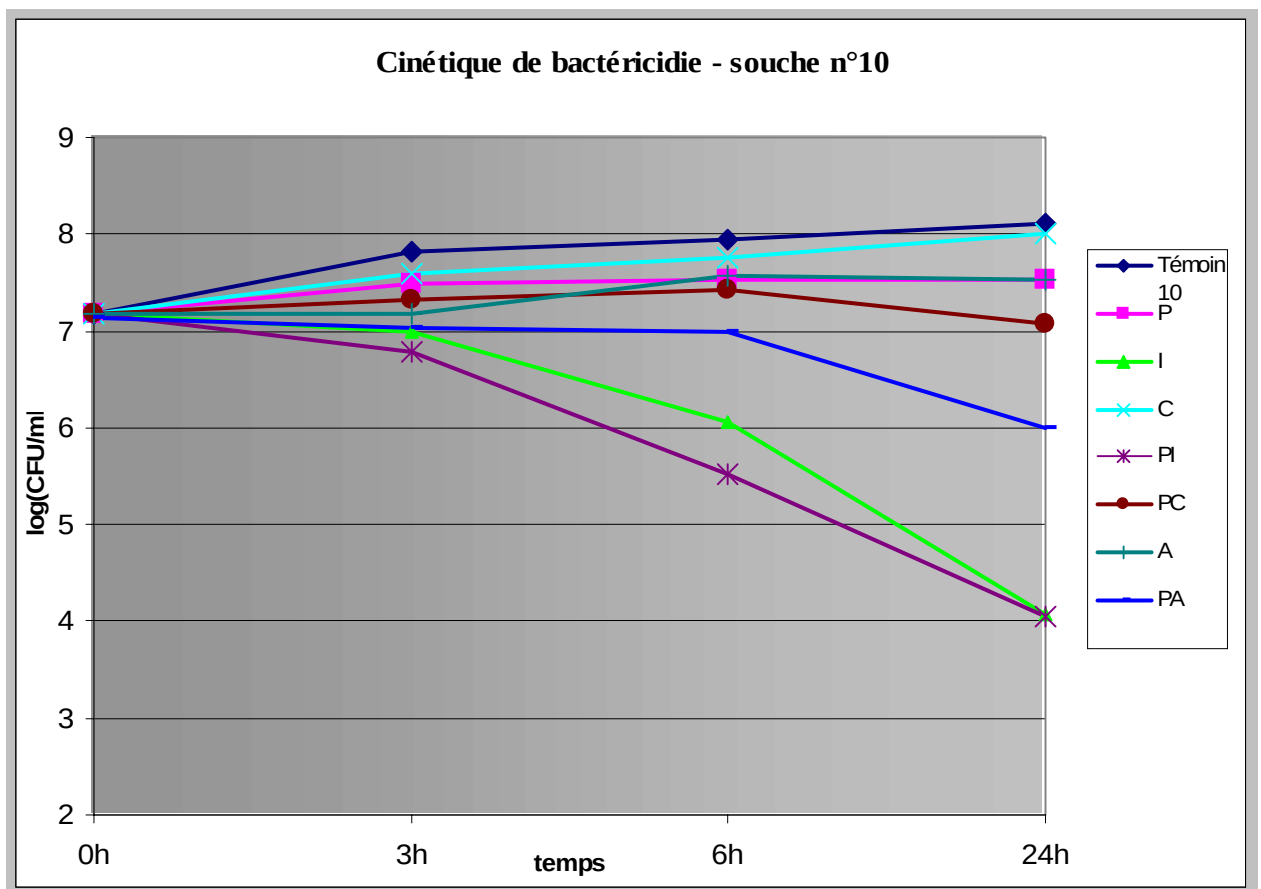


Fig. 14a : Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°10 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PC).

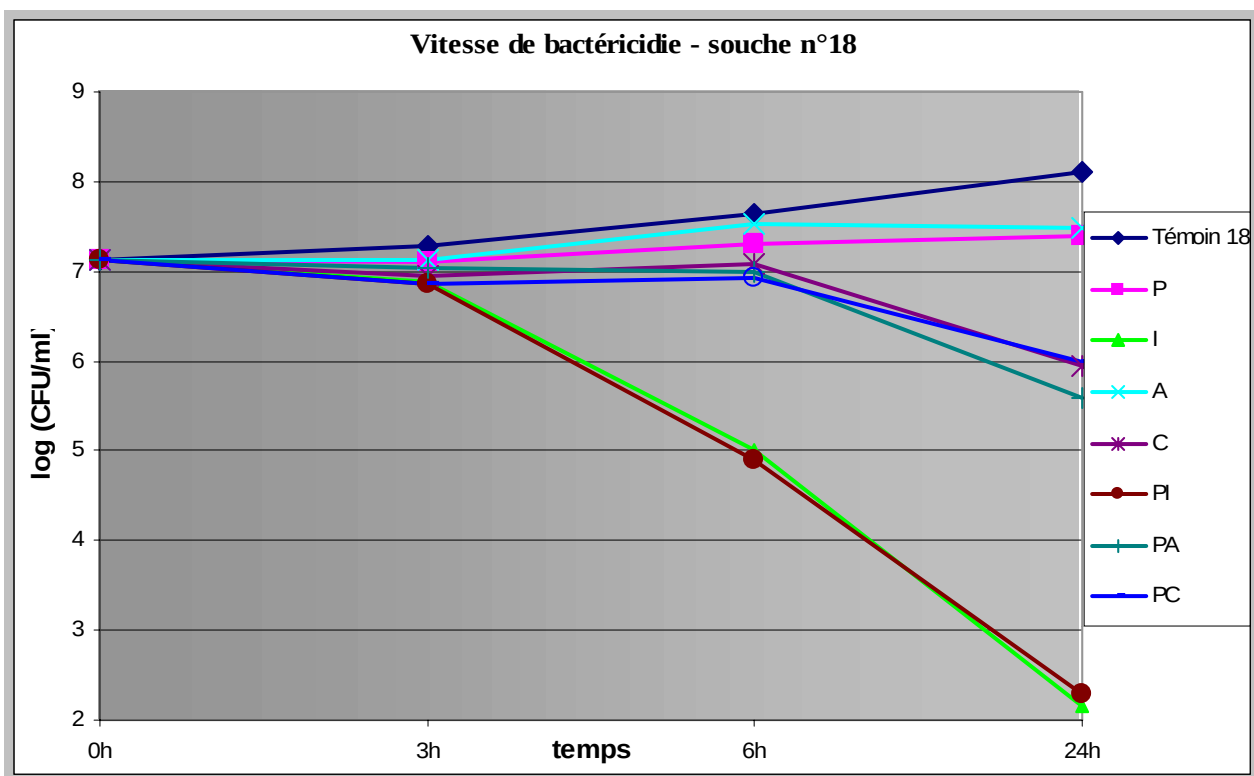


Fig. 14b : Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°18 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine, de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC). La souche 18 est sensible à l'imipénème qui a un effet bactéricide important sur la souche dès 6 heures.

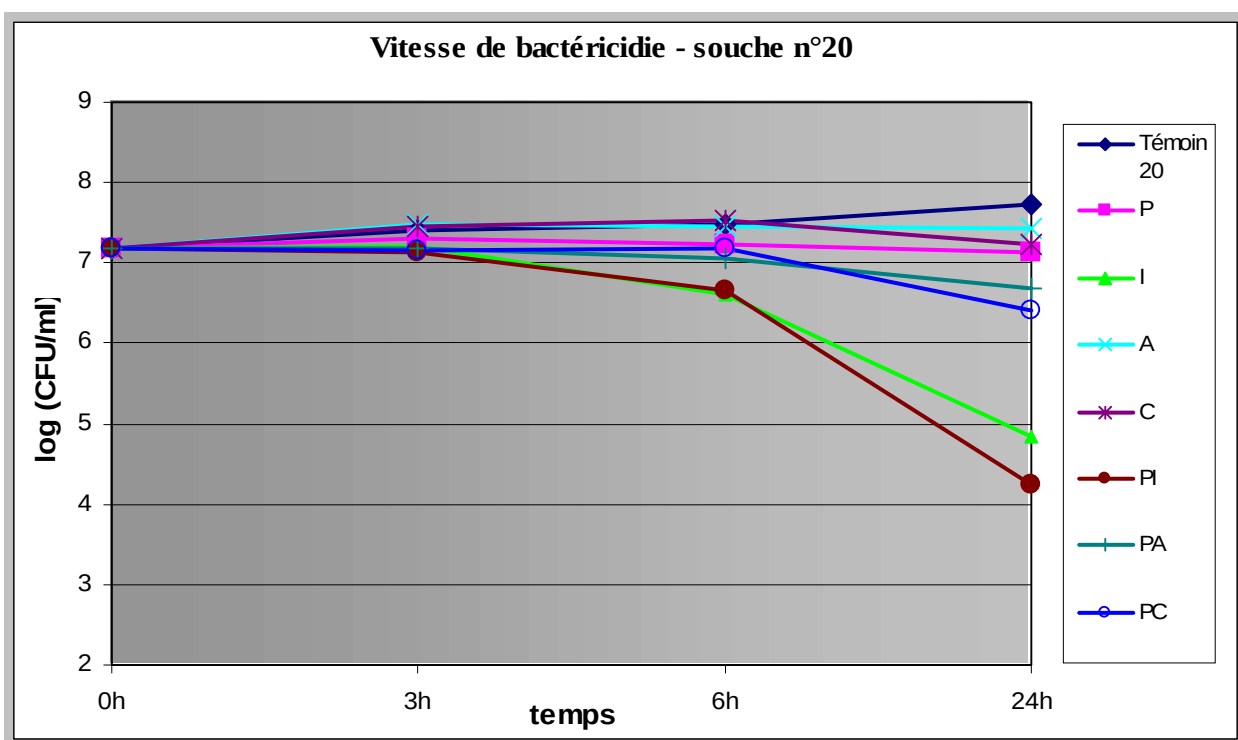


Fig. 14c : Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°10 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine et de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC).

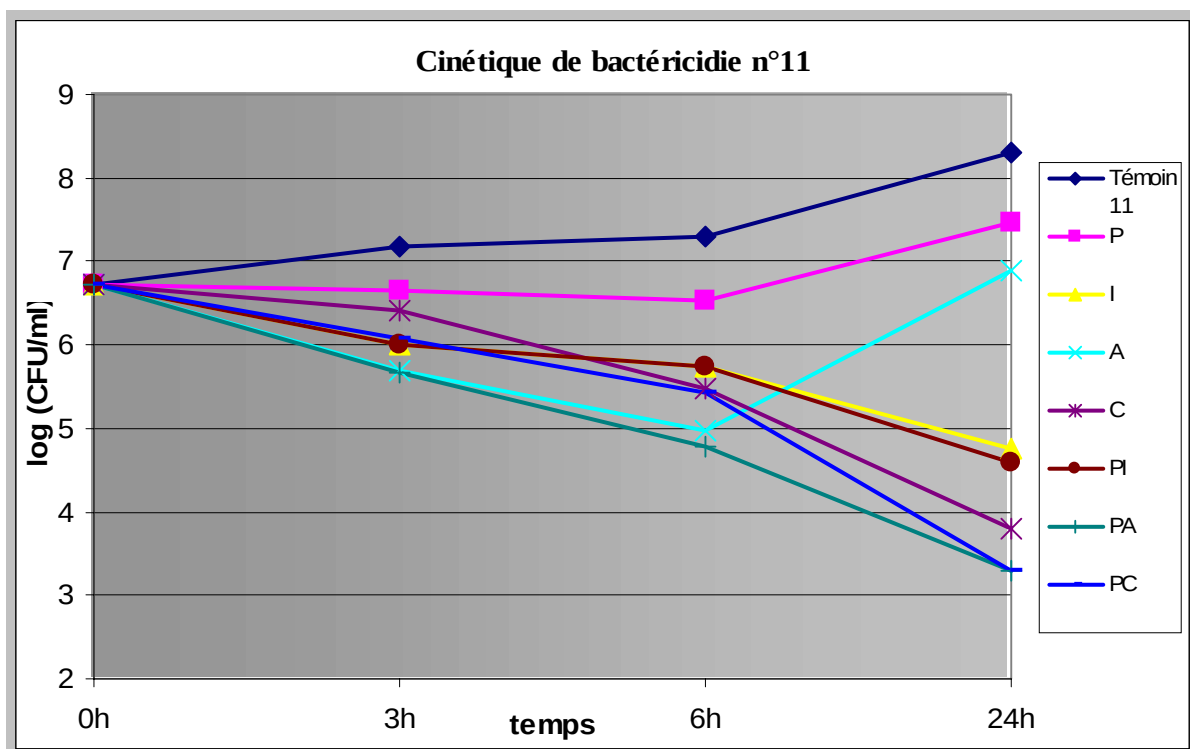


Fig. 14d : Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°11 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine et de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC).

V. Détermination des points isoélectriques des β -lactamases pour 13 souches

La détermination des points isoélectriques a été effectuée sur la souche ATCC et 12 des 16 isolats cliniques : n° 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 16, 18, 20.

En présence de benzylpénicilline pour substrat, une activité β -lactamase a été mise en évidence après migration électrophorétique.

Les β -lactamases présentent des points isoélectriques supérieurs ou égaux à une valeur située aux environs de 7,5. L'absence de marqueur ayant des P_i supérieur à 7,6 ne permet pas d'estimer avec précision les P_i de nos souches.

On peut, cependant individualiser 4 types de bandes A, B, C, D, par ordre de P_i croissant (fig. 15) :

- Bande **A** située à environ 7,5 retrouvée chez les souches 1, 2, 9, 10, 18, 20
- Bande **B** située retrouvée chez les souches ATCC, 1, 2,
- Bande **C** située retrouvée chez les souches ATCC, 16
- Bande **D** située retrouvée chez 7, 8, 11
-

Ces bandes donnent lieu à 4 profils électrophorétiques schématisés dans la figure 7. :

- **Profil 1** : - bandes B et C
- souches ATCC, 16
- **Profil 2** : - bande A et B
- souches 1, 2, 9, 10, 18, 20
- **Profil 3** : - bande D
- souches 4, 6, 7, 8
- **Profil 4** : - bande C et D
- souche 11

Aucune bande n'a été révélée pour la souche 14.

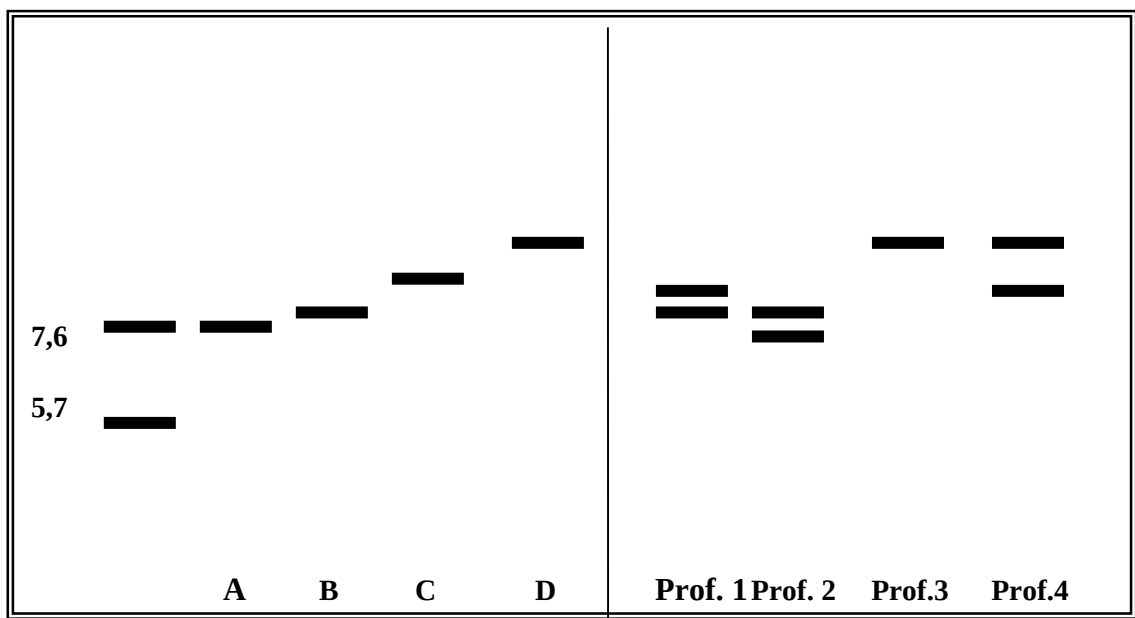


Figure 15 : schéma des différentes bandes ainsi que les profils obtenues par isoélectrofocalisation sur les 16 souches étudiées.

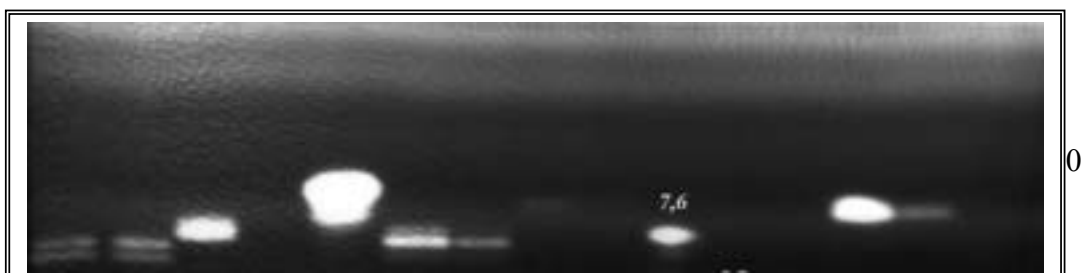


Fig.16 : Détermination des points isoélectriques par isofocalisation

On peut estimer la valeur du PI de la β -lactamase la plus acide (bande A) à environ 7,5. L'absence de marqueur ayant un PI situé au-delà de 7,6 ne nous permet pas de déterminer les valeurs des 3 autres β -lactamases.

V. Etude génomique

Le polymorphisme de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé permet de visualiser de grands fragments de l'ADN total d'une souche bactérienne : l'ensemble des fragments représente une empreinte caractéristique (pulsotype) de la souche analysée.

L'étude génomique a été appliquée aux 16 souches d'*A. xylosoxidans*.

Parmi les 3 endonucléases testées (Xba I, Spe I, Nod I), seule Xba I a permis d'obtenir une séparation permettant une analyse comparative des souches. L'enzyme Xba I génère 25 à 35 fragments dont la taille est comprise entre < 50 kb et 500 kb, et a permis de différencier 11 pulsotypes.

Les profils de restriction obtenus (fig. 17 et 18) mettent en évidence 11 pulsotypes différents parmi les 16 patients.

Chaque patient héberge une souche présentant un profil électrophorétique différent.

On remarque que les souches 1 et 2 ont le même profil électrophorétique. Il en va de même pour les couples 4 et 6, 7 et 8, 9 et 10.

Il est intéressant de remarquer que les souches 7 et 8, qui présentent un même pulsotype, ont des antibiotypes différentes. Il en va de même pour le couple de souche 9 et 10.

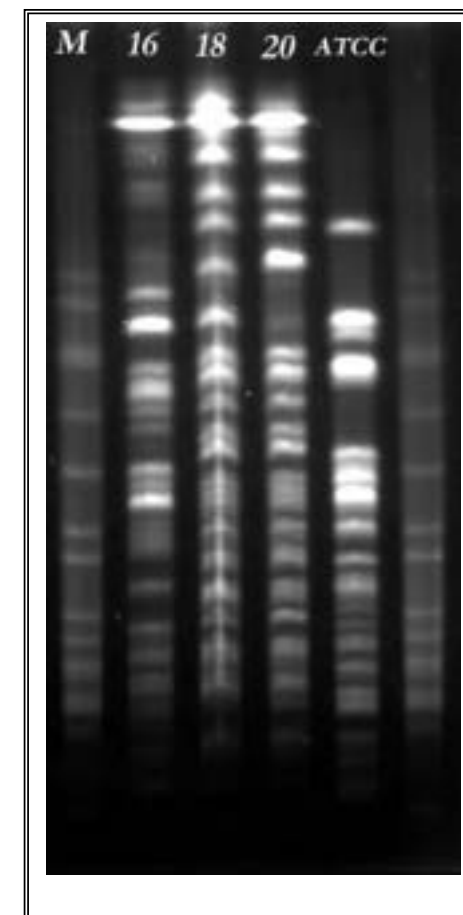
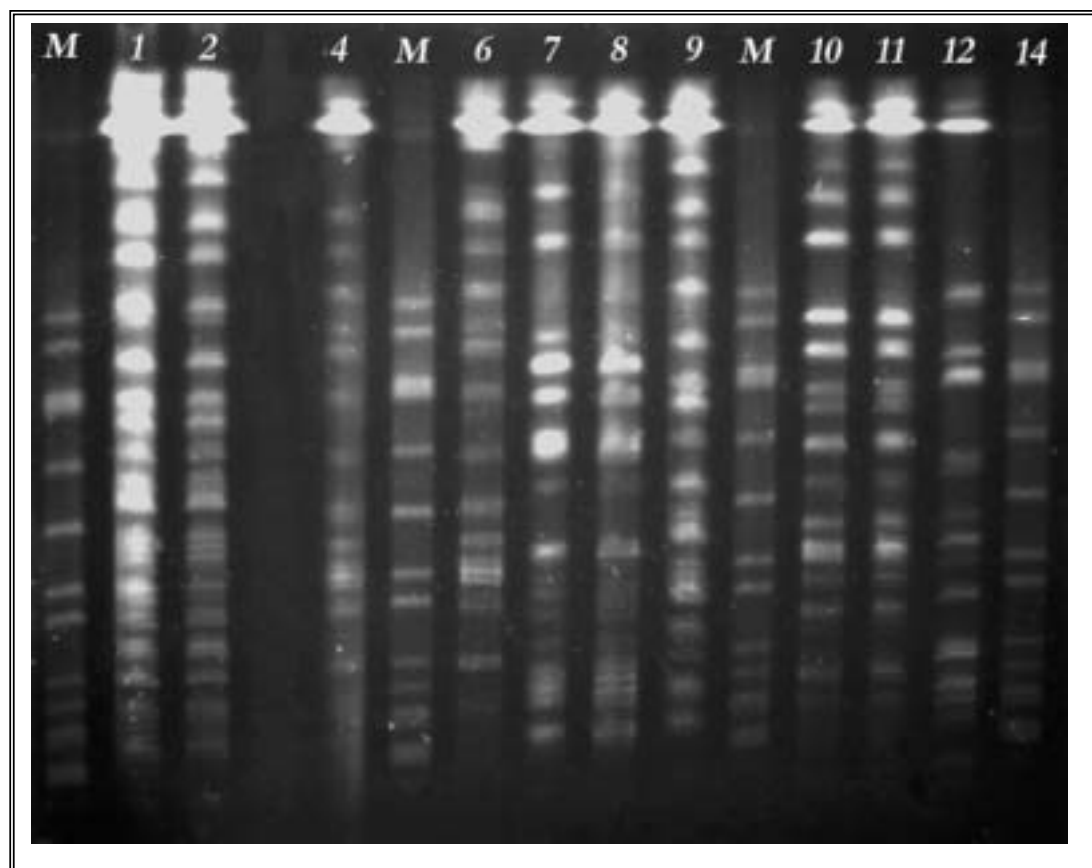


Fig. 17 : Electrophorèse en champ pulsé effectuée chez 14 souches parmi les 16 initiales (les souches 15 et 19 n'ont pas été manipulées).

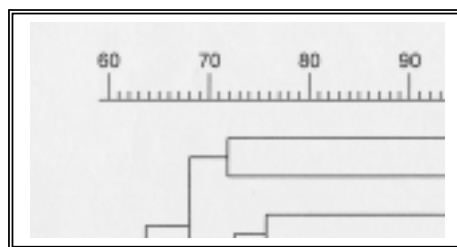


Fig. 18: Dendrogramme effectué sur 13 souches parmi les 16 étudiées en plus de l'ATCC , à partir des profils de restriction obtenu après action de l'enzyme XbaI et après analyse par le logiciel GelCompar 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique).

B. Etudes *in vivo*

L'étude *in vivo* a été effectuée pour la souche

Les tableaux montrent pour chaque groupe thérapeutique le nombre d'animaux étudiés, la valeur moyenne des log₁₀ UFC/g de végétation et son intervalle de confiance à 95%.

L'efficacité thérapeutique en fonction du groupe expérimentale est représentée sur la figure 19 et le tableau X

La comparaison des groupes entre eux par le test Scheffe montre une différence significative entre le groupe imipénème et le groupe témoin, ainsi que le groupe pipéracilline-imipénème et le groupe témoin.

On n'observe pas de différence significative entre le groupe témoin et le groupe pipéracilline.

Groupes expérimentaux	Nombre d'animaux	Log ₁₀ UFC/g ± IC95%
Témoins	5	6,9 ± 1,1
IPM	5	2,7 ± 0,6
PIP	5	6,5 ± 0,6
PIP-IPM	5	3,0 ± 0,2

**Tableau IX : Comparaison de 3 régimes thérapeutiques *in vivo* : pipéracilline (PIP), imipénème (IPM), association pipéracilline-imipénème. Souche testée = n°10.
Test de Scheffe après analyse de variance : a : p < 0,05 *versus* témoins.**

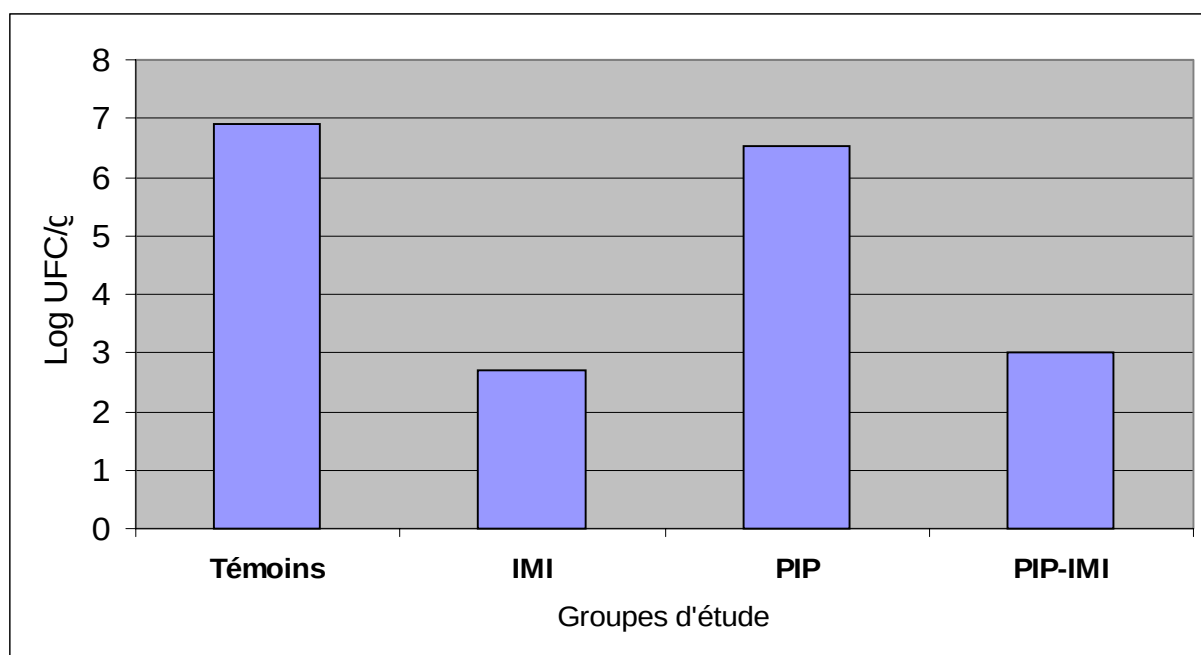


Fig. 19 : Effet de la pipéracilline, l'imipénème et leur association in vivo sur la souche 10 d'*A. xylosoxidans*.

DISCUSSION

Achromobacter xylosoxidans est un bacille à Gram négatif, présentant une large répartition écologique. Sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques explique sa présence dans l'environnement hospitalier, notamment hydrique (liquides divers, humidificateurs, systèmes d'hémodialyses...) et qu'elle puisse être à l'origine d'infections nosocomiales sporadiques ou épidémiques liées à l'utilisation de matériel contaminé.

La revue de la littérature consacrée à *A. xylosoxidans* indique qu'il est l'agent étiologique d'infections nosocomiales telles que septicémies, pneumopathies, infections urinaires, endocardites, otites, péritonites, et suppurations diverses. Ces infections ont lieu principalement chez des patients dont le système immunitaire est déficient, ou ayant une maladie sous-jacente (cancer, neutropénie, diabète, séropositif pour le HIV, alcoolisme, nouveau-né) et notamment chez les patients atteints de mucoviscidose.

Durant les dix dernières années, l'émergence de pathogènes inhabituels, pour la plupart multirésistants, a profondément compliqué la prise en charge thérapeutique dans la mucoviscidose : *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *A. xylosoxidans* sont de plus en plus fréquemment isolés dans le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose avec une prévalence estimée dans la littérature entre 1 et 10 % (United States CF Foundation, Annual Data Report, 1998 ; Burns, 1998). A l'hôpital de Nantes, 6 % des patients sont colonisés par *A. xylosoxidans*, en 2002 sur un effectif de 90 patients adultes. La prévalence rencontrée dans la littérature est probablement sous-estimée en raison des difficultés d'isolement et d'identification d'*A. xylosoxidans*.

En effet, si c'est un germe non exigeant, poussant sur de nombreux milieux, les colonies apparaissent, en 24 heures à 37°C très fines et transparentes. *A. xylosoxidans* croît sur un milieu cétrimide et à 41°C comme *Pseudomonas aeruginosa*. Un laboratoire de bactériologie doit donc être attentif et incuber les milieux au moins 48-72 heures. *A. xylosoxidans* peut donc être à l'origine d'erreur d'identification.

Dans une étude de 2001, parmi les 106 souches identifiées *A. xylosoxidans*, provenant de 78 patients atteints de mucoviscidose, 11% étaient d'autres bacilles à Gram négatif oxydase positive (9 *pseudomonas aeruginosa*, 1 *Peudomonas sp.*, 1 *Burkholderia cepacia*, 1 *Stenotrophomonas maltophilia*) (Saiman, 2001).

Ceci est d'autant plus problématique en ce qui concerne les bactéries du complexe « cepacia » (Blecker-Shelly, 2000 ; McMenamin, 2000) qui sont associées à un

accroissement important de la morbidité et de la mortalité, et qui nécessitent des mesures drastiques d'isolement du patient et d'éradication du germe.

En ce qui concerne l'implication d' *A. xylosoxidans* en clinique des patients mucoviscidosiques, les avis divergent : si deux études suggèrent que l'exacerbation des signes broncho-pulmonaires des patients peut être imputée à la colonisation par *A. xylosoxidans* (Pan, 2000 ; Moissenet, 1997), une étude de 557 patients affirme que l'espèce n'a pas d'incidence significatives sur l'état des patients (Tan, 2002). Il a été montré, toutefois, que l'espèce possède un pouvoir proinflammatoire pouvant causer une détérioration clinique (Hutchison, 2000).

Pour pallier ce problème d'identification et augmenter la spécificité d'identification, Liu et coll. ont mis au point une PCR de l'ADN ribosomal d'*A. xylosoxidans* (Liu, 2002). Les amorces utilisées montrent une excellente sensibilité pour *A. xylosoxidans*. 3 autres espèces du genre *Achromobacter* (*A. ruhlandii*, *A. piechaudii*, *A. denitrificans*) donnent des réactions positives. Les espèces phylogénétiquement proches (cf figure 1), comme les bactéries du complexe « *cepacia* », celles du genre *Bordetella*, SM, *Pseudomonas aeruginosa*, donnent des réactions négatives.

Peu d'étude sur la sensibilité de *A. xylosoxidans* sont répertorié dans la littérature, cependant la multirésistance d'*A. xylosoxidans* et son comportement particulier vis-à-vis des antibiotiques sont aussi des paramètres qui doivent alerter le bactériologiste.

Dunne et coll., en 1995, a montré dans son étude épidémiologique sur 16 patients mucoviscidosiques colonisés par *A. xylosoxidans* que plus de 85% des souches sont sensibles aux pénicillines à large spectre, à la ceftazidime et au cotrimoxazole ; 75 % sont sensibles à l'imipénème ; 50% sont sensibles à la ciprofloxacine (Dunne, 1995).

L'étude de la sensibilité de 16 souches cliniques d'*A. xylosoxidans*, isolées dans l'hôpital de Nantes entre 1998 et 2001, vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques confirme en partie les résultats de la littérature, notamment la résistance constante de cette espèce à la fosfomycine, à la plupart de céphalosporines (Mensah, 1990 ; Rolston, 1990 ; Mensah, 1989 ; Glupczynsky, 1988).

50% des isolats sont résistants aux pénicillines et plus de la moitié au cotrimoxazole. Bien que *A. xylosoxidans* soit connu pour être résistant aux aminosides, 4 souches de notre

études sont sensibles à l'amikacine (souches 1, 2, 4, 9) ; dans l'étude de Dunne et coll., 2 souches sur les 16 sont sensibles à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine (Dunne, 1995). Par ailleurs, l'étude, par Mensah et coll., de 41 souches d'*A. xylosoxydans* à 38 antibiotiques, montre que 100 % des souches sont sensibles au latamoxef, alors qu'aucune des souches de notre étude y est sensible (Mensah, 1989).

L'étude de l'action des β -lactamines sur les 16 isolats, par antibiogramme en milieu gélosé et par la mesure des CMI de 7 β -lactamines, a permis de distinguer 2 comportements vis-à-vis des β -lactamines : un phénotype « sensible aux pénicillines », et un phénotype « résistant aux pénicillines ».

Le comportement des souches appartenant au phénotype sensible confirme les études précédentes (Glupzinsky, 1987 ; Mensah, 1989 ; Mensah, 1990, Rolston, 1990) ; il est caractérisé par une grande sensibilité à l'amoxicilline, à la ticarcilline et à la pipéracilline, les valeurs de CMI les plus basses étant obtenues pour la pipéracilline.

Le phénotype résistant est caractérisé par la résistance à l'amoxicilline et aux carboxy- et uréido-pénicillines. On observe une augmentation des CMI vis-à-vis des carbapénèmes (imipénème et méropénème).

Ces 2 comportements ont été décrits la première fois par Mensah et coll. en 1989 (Mensah, 1989) lors d'une étude concernant 41 souches impliquées dans des infections nosocomiales. Les comportements des souches vis-à-vis des antibiotiques concordent globalement avec ceux retrouvés dans notre étude. Cependant, on n'observe pas de synergie entre les pénicillines et les inhibiteurs de β -lactamases alors que les souches dans l'étude de Mensah présente une synergie nettement significative, et les souches de notre étude ont une résistance plus élevée à la ceftazidime :

- ☞ Phénotype sensible : $\varnothing = 21,5 \pm 5 \text{ mm}$ dans l'étude de Mensah versus $15,2 \pm 5,9 \text{ mm}$ dans notre étude
- ☞ Phénotype résistant : $\varnothing = 18,4 \pm 5,8 \text{ mm}$ dans l'étude de Mensah versus $6,9 \pm 2,5 \text{ mm}$ dans notre étude

Non seulement les souches de notre étude sont plus résistantes à la ceftazidime que dans l'étude de Mensah, mais le passage du phénotype sensible au phénotype résistant s'accompagne d'une haute résistance à la ceftazidime.

Le fait que nos souches soient isolées de patients qui reçoivent régulièrement des antibiothérapies anti-pyocyaniques peut expliquer la plus grande résistance à cette céphalosporine.

La résistance aux bêta-lactamines résulte le plus souvent de l'association de plusieurs mécanismes qu'il est habituel de classer en 4 catégories : défaut de pénétration intra-bactérienne de l'antibiotique, inactivation, efflux de l'antibiotique par des systèmes enzymatiques bactériens et défaut d'affinité de l'antibiotique pour la cible.

L'imperméabilité joue un rôle essentiel dans la résistance naturelle d'espèces variées. Ainsi il est probable que la multi-résistance d'*A. xylosoxidans*, comme celles des autres bacilles à Gram négatif aérobies stricts (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Flavobacterium*), soit en grande partie liée aux propriétés de leur paroi. Différents travaux ont suggéré puis démontré que la multi-résistance de *P. aeruginosa* résulte en grande partie de la faible perméabilité de sa paroi (au moins 100 fois plus faible que celle d'*Escherichia coli* (Nikaido, 1991 ; Angus, 1982) ; des modifications du LPS en seraient en partie responsables. Il a été, d'autre part, démontré qu'*Alcaligenes faecalis* (espèce voisine d'*A. xylosoxidans*) possède des porines de taille inférieure à celles d'*Escherichia coli* dont la conséquence est une diffusion beaucoup plus faible des β -lactamines (Ishii, 1988) ; aucun travail n'a été rapporté pour l'espèce *A. xylosoxidans*.

D'autre part, une diminution d'affinité des β -lactamines pour la PBP-3 a été suggérée pour expliquer le manque d'activité des β -lactamines envers cette espèce (Glupzinsky, 1987).

En ce qui concerne les β -lactamines, qu'il s'agisse de la résistance naturelle ou de la résistance acquise, la production d'enzymes inactivatrices (β -lactamases) est reconnue comme le mécanisme le plus répandu chez les bacilles à Gram négatif. De très nombreuses β -lactamases ont été identifiées ; elles sont très variées quant à leur support génétique, chromosomique ou plasmidique, ainsi que par leurs caractéristiques enzymatiques (profil de substrat et d'inhibition), et génétique (séquence).

L'étude des β -lactamases effectuée sur nos isolats se limite à la technique d'électrophorèse par isofocalisation qui permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). C'est un paramètre relativement spécifique.

On a pu ainsi mettre en évidence 4 bandes (A, B, C, D) correspondant à 4 β -lactamases caractérisées par des pI différents et situés à des valeurs de pH basique. Les valeurs des pI

sont élevées par rapport à celles retrouvées chez les autres bactéries : TEM ($\approx 5,5$), SHV ($\approx 7,5$), PSE ($\approx 5,7$).

Différentes données suggèrent que le phénotype sensible pourrait être lié à la production d'une β -lactamase de type « céphalosporinase » : (i) la résistance aux céphalosporines associée à une grande sensibilité aux pénicillines à large spectre, (ii) la céfoxitine induit une résistance à la pipéracilline, (iii) des bandes de pI basiques sont mises en évidence par isoélectrofocalisation.

Levesque et coll. ont rapporté la production d'une β -lactamase constitutive de pI 7,4 par une souche d'*A. xylosoxidans* (Levesque, 1982).

Nous n'avons pas observé de CARB. Cette β -lactamase, initialement décrite chez *Pseudomonas aeruginosa* et appelée PSE (*Pseudomonas* Specific Enzyme), est caractérisée par un pI de l'ordre de 5,7, et par une forte hydrolyse de la carbénicilline.

Decré et coll., caractérise, chez 11 souches d'*A. xylosoxidans* résistantes aux pénicillines, une CARB-2 (PSE-1) (Decré, 1995).

Les bandes retrouvées en isoélectrofocalisation à pH basique nous font évoquer des β -lactamases de type OXA. Ce qui vient appuyer cette hypothèse est que la β -lactamase OXA a été décrit comme pouvant être inhibée par l'imipénème (Philippon ; 1990)

D'autres types de β -lactamases ont été décrits chez des souches d'*A. xylosoxidans* : une céphalosporinase chromosomique de pI 9,3 inhibé par l'acide clavulanique en présence de benzylpénicilline a été rapportée par Levesque (Levesque, 1983), et une β -lactamase constitutive de pI 9,8 inhibée par l'acide clavulanique (Fujii, 1985).

En comparant les profils électrophorétiques de deux souches appartenant à un même patient : la souche 9 (sensible aux pénicillines) et la souche 10 (résistant aux pénicillines), on peut se permettre d'imputer la résistance de la souche 10 à une hyperproduction et non à une acquisition de β -lactamase. En effet, on n'observe pas d'acquisition de nouvelle bande en isoélectrophorèse.

Decré et coll., dans un article concernant la sélection d'une souche résistante, suggèrent fortement le mécanisme d'hyperproduction, en se basant sur les arguments suivants : (i) la β -lactamase produite est inductible, (ii) un mutant résistant, aisément sélectionné in vitro, présente des caractéristiques identiques à la souche isolée in vivo, (iii) aucune des souches n'héberge de plasmide, et enfin (iiii) les profils de restriction de l'ADN total des 2 souches, sensible et résistante, sont identiques.

La comparaison de nos résultats avec ceux trouvés dans la littérature concernant les caractéristiques des β -lactamases d'*A. xylosoxidans* est limitée du fait de la mise en œuvre de cette seule technique. D'autres paramètres peuvent être étudiés. Ainsi, la détermination des profils d'activité enzymatique, par quantification des vitesses d'hydrolyse d'un substrat donné, permet de définir un type enzymatique (pénicillinase, céphalosporinase, céfuroximase...). Le test d'induction des β -lactamases peut aussi être entrepris.

L'étude génomique, réalisée par électrophorèse en champ pulsé a permis de comparer les souches. Cette technique, efficace et relativement simple, est souvent employée dans des investigations épidémiologiques (Lin, 1997 ; Maslow, 1993).

Dans notre étude, on a pu ainsi montrer que chaque patient hébergeait 1 souche distincte. Et pour un patient donné, les souches d' *A. xylosoxidans* retrouvées après 2 ou 4 mois voire 1 an plus tard montrait les mêmes profils de restriction. Le patient est toujours colonisé ou infecté par une même souche.

La possibilité d'une transmission inter-humaine ne semble pas être un facteur déterminant dans l'acquisition d'*A. xylosoxidans*. Perlroche et coll. décrit le cas de 2 frères atteints de mucoviscidose et colonisés par la même souche d'*A. xylosoxidans*. Ces 2 patients, bien que soumis au même environnement familial et bien qu'utilisant les mêmes équipements d'aérosolthérapie, ont été colonisés à *A. xylosoxidans*, à 3 ans d'écart (Peltroche, 1998). A Nantes, une étude consacrée à « *A. xylosoxidans* et mucoviscidose » et concernant 12 patients montre que 2 individus de la même fratrie ont des dates d'acquisition *A. xylosoxidans* espacées de 3 ans (données non publiées).

Les souches 7 et 8 isolées chez le même patient JMT présentent des profils de restriction identiques ; il en est de même pour les souches 9 et 10. Or, les souches 7 et 9 sont des souches sensibles aux pénicillines et les 8 et 10 sont résistants. On suggère une acquisition de résistance in vivo.

En 1992, Decré et coll. décrivent chez une femme hospitalisée pour une méningite à *A. xylosoxidans*, une souche ayant acquis une résistance aux pénicilline à large spectre 1 mois après un traitement par la pipéracilline 12g/24h et péfloxacin 1,2g/24h (Decré, 1992), montrant ainsi pour la première fois la sélection in vivo d'une souche résistante.

La sélection d'une souche résistante d'*A. xylosoxidans* semble être un phénomène à prendre en compte dans la thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose et justifierait donc l'emploi d'une bithérapie.

D'une manière générale, l'action synergique entre antibiotique est de plus en plus recherchée en raison de la grande résistance des nouveaux pathogènes dans la mucoviscidose. Les antibiotiques sont testés par paire à des concentrations utilisables en clinique. Peu d'article étudie l'effet des associations d'antibiotiques sur *A. xylosoxidans* isolé de patients mucoviscidosiques. Deux articles de Saiman et coll. sont consacrées à l'étude d'association. Dans l'une, une action additive a été notée pour les associations : chloramphénicol-minocycline, ciprofloxacine-imipénème et ciprofloxacine-méropénème, et dans l'autre, étudiant des associations avec des macrolides, il n'a pas été observé de synergie.

Dans notre étude une synergie entre la pipéracilline et l'imipénème a été observée sur certaines souches (sensibles et résistantes aux pénicillines) par la méthode de l'antibiogramme. Ces synergies ont été confirmées par la méthode des bandelettes et par la technique de cinétique de bactéricidie.

L'imipénème est l'antibiotique le plus bactéricide pour 3 souches sur 4 qui sont résistantes aux pénicillines. Et ceci, même chez les souches qui présentent une CMI à l'imipénème supérieure à 32 mg/l. Par contre, l'association pipéracilline-imipénème n'apporte aucun bénéfice à la bactéricidie.

Une souche (la souche 11) présente un profil particulier par rapport aux autres souches, car l'imipénème n'agit pas en synergie avec la pipéracilline comme le montrent les méthodes des disques et les cinétiques de bactéricidie. L'amikacine et le ciprofloxacine agissent plus efficacement sur la souche. C'est une souche relativement sensible à la ciprofloxacine ($\varnothing = 19\text{mm}$), ce qui explique son action efficace en cinétique de bactéricidie.

Afin de valider ces résultats *in vitro*, nous avons voulu vérifier l'action de l'imipénème *in vivo*. Nous avons choisi le modèle expérimental d'endocardite car c'est un modèle simple et reproductible (Cremieux, 1999). Il s'agit d'un modèle d'infection aiguë, à fort inoculum, permettant une évaluation sur les 48 premières heures de traitement.

Les résultats que nous avons obtenus *in vivo* confirment les données *in vitro*, à savoir une efficacité de l'imipénème sur les deux souches.

Le modèle a cependant des limites dans cette étude. C'est tout d'abord un modèle d'infection aiguë, alors que la mucoviscidose est une infection chronique ; les bactéries infectant chroniquement un tissu se trouvent dans un état physiologique différent des bactéries fraîchement inoculées. Les bactéries peuvent se trouver dans un état quiescent

qui les rend différemment sensibles vis-à-vis de certains antibiotiques (β -lactamines). On a pu observé chez certaines souches issues de patients atteints de mucoviscidose, la formation de mucopolysaccharides (slime). Ces souches muqueuses, à l'instar des souches mucoïdes de *P. aeruginosa*, aboutissent à la formation d'un biofilm au sein même des tissus infectés, empêchant la pénétration des antibiotiques.

Par ailleurs, la végétation est un désert immunologique où les défenses de l'hôte n'interviennent pas, contrairement aux poumons.

Il convient donc, dans une étude ultérieure de tester un modèle de pneumopathie (modèle murin, par exemple).

CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de 16 souches d'*A. xylosoxidans* a permis de vérifier que ce germe est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques, et d'observer deux comportements distincts vis-à-vis des β -lactamines : un phénotype « sensible » aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline et pipéracilline) et un phénotype « résistant ».

Des tests in vitro et les données de la littérature nous laissent penser que le phénotype sensible est du à une céphalosporinase chromosomique inductible.

Le phénotype résistant pourrait être lié à une hyper production de β -lactamase de type OXA.

Une synergie entre la pipéracilline et les carbapénèmes (imipénème et méropénème) a été observée par la technique d'antibiogramme chez certaines souches d'*A. xylosoxidans* appartenant aux deux phénotypes.

Une souche a présenté une synergie pipéracilline-amikacine.

Une cinétique de bactéricidie a montré une efficacité de l'imipénème et une inefficacité de la pipéracilline chez des souches résistantes en antibiogramme à l'imipénème ; en revanche, l'association pipéracilline-imipénème ne montre aucune synergie.

Ces observations vues en cinétique ont été vérifiées in vivo dans un modèle d'endocardite du lapin.

En terme de perspective, nous suggérons :

- ☞ Une étude plus approfondie des β -lactamases (profils d'activité enzymatique, quantification des vitesses d'hydrolyse, test d'induction).
- ☞ Une recherche d'autres associations, notamment pipéracilline et d'autres aminosides.
- ☞ Une étude plus poussée de l'inhibition de la pipéracilline par l'imipénème (étude de cinétique d'inhibition enzymatique)
- ☞ D'explorer un modèle animal plus approprié pour l'infection broncho-pulmonaire : modèle de pneumopathie murin

BIBLIOGRAPHIE

1. **ANGUS, CAREY, CARON, KROPINSKY, HANCOCK.** Outer membrane permeability in *pseudomonas aeruginosa* : comparison of wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1982, 21: 229-309
2. **APPELBAUM P.C. & CAMPBELL D.B.** Pancreatic abcess associated with *Achromobacter* Group Vd biovar 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 1980, 12: 282-283
3. **ARROYO J.C., JORDAN W., LEMA M.W. & BROWN A.** Diversity of plasmids In *Achromobacter xylosoxidans* isolates responsible for a seemingly common-source nosocomial outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25: 1952-1955
4. **BEN SALEM N, SALEM N, MONASTIRI K, SBOUI H, BOUKADIDA J, SNOUSSI N.** Neonatal meningitis due to *Alcaligenes xylosoxidans* contaminating aqueous solution of eosin. *Arch Pediatr*. 1999 ; 6 :226-7.
5. **BERINGER PM, APPLEMAN MD.** Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med*. 2000 ; 6 : 545-50. Review.
6. **BERGEY D.H., HARRISON F.C., BREED R.S., HAMMER B.W., HUNTOON, F.M.** Manual of determinative bacteriology, 1st ed., 1923. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
7. **BIZET C, TEKAIA F, PHILIPPON A.** In-vitro susceptibility of *Alcaligenes faecalis* compared with those of other *Alcaligenes* spp. to antimicrobial agents including seven beta-lactams. *J Antimicrob Chemother*. 1993. 32 : 907-10.
8. **BLECKER-SHELLY, SPILKER, GRACELY, COENYE, VANDAMME, LIPUMA.** Utility of commercial test systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J. Clin. Microbiol*. 38 : 3112-3115
9. **BOUKADIDA J, MONASTIRI K, SNOUSSI N, JEDDI M, BERCHE P.** Nosocomial neonatal meningitis by *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by aqueous eosin. *Pediatr Infect Dis J*. 1993; 12 : 696-7.
10. **BRISOU J.** Essai sur la systématique du genre *Achromobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1953, 84 : 812-814
11. **BRISOU J. & PREVOT A.R.** Etudes de systématique bactérienne. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1954, 86: 722-728.
12. **BRUEL H, CHABROLLE JP, PINON G, POINSOT J.** Neonatal meningitis caused by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Arch Pediatr*. 1997. 4 : 260-2.
13. **BURNS J.L., EMERSON J., STAPP R.J, YIM L.D., KRZEWSKI J., LOUDEN L., RAMSEY W.B., CLAUSEN R.C.** Microbiology of sputum from

patients at cystic fibrosis centers in the united states. Clinical Infectious Diseases, 1998 ; 27 : 158-63.

14. **BURNS, VAN DALFSEN, SHAWAR, OTTO, GARBER, QUAN.** Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. J infect Dis 1999 ; 179 : 1190-6.
15. **CASTELLANI A. & CHALMERS A.J.** Sur la classification de certains groupes de bacilles aérobies de l'intestin humain. Annales de l'Institut Pasteur, 1920, 34: 600-621.
16. **CHANDRASEKAR P.H., ARATHOON E. & LEVINE D.P.** Infections due to *Achromobacter xylosoxidans*. Case report and review of literature. Infections, 1986, 14: 279-282.
17. **CHERON M., ABACHIN E., GUEROT E., EL-BEZ M. & SIMONET M.** Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32: 1023-1026
18. **CIESLAK T.J. & RASZKA W.V.** Catheter-associated sepsis due to *Alcaligenes xylosoxydans* in a child with AIDS. Clinical Infectious Diseases, 1993, 16: 592-593
19. **CONN-H.J.** Validity of the genus *Alcaligenes*. Journal of Bacteriology, 1942, 44: 353-360
20. **CREMIEUX A.C.** Pharmacocinétique et pharmacodynamie des antibiotiques dans les endocardites. Dans : Bases biologiques de l'antibiothérapie. Bergogne-Bérézin, Brogard, 1999, Paris.
21. **D'AMATO R.F., SALEMI M., MATHEWS A., CLERI D.J. & REDDY G.** *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *Xylosoxidans*) meningitidis associated with a gunshot wound. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26: 2425-2426.
22. **DE LEY J., SEGERS P., KERSTERS K., MANNHEIM W. & LIEVENS A.** Intra- and intergenetic similarities of *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons; proposal for a new family *Alcaligeneaceae*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36: 405-414.
23. **DECRE D., ARLET G., DANGLLOT C., LUCET J.C., FOURNIER G., BERGOGNE-BEREZIN E. & PHILIPPON A.** A β -lactamase-overproducing strain of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* isolated from a case of meningitidis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1991, 30: 769-779.
24. **DECRE D., ARLET G., DANGLLOT C., LUCET JC, FOURNIER G, BERGOGNE-BEREZIN E, PHILIPPON A.** A beta-lactamase-overproducing

strain of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* isolated from a case of meningitis. J Antimicrob Chemother 1992;30:769-79

25. **DECRE D, ARLET G, BERGOGNE-BEREZIN E, PHILIPPON A.** Identification of a carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:771-4
26. **DENTON M., TODD NJ., LITTLEWOOD JM.** Role of anti-pseudomonal antibiotics in the emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996 ; 15 : 402-5
27. **DRUGEON H, LEGALLOU F, CAILLON J.**1990. Méthodes d'études de l'activité bactéricide. p113-126. Dans : Bactéricidie par Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F. Edition Maloine, Paris
28. **DUGGAN JM., GOLDSTEIN SJ., CHENOWETH CE., KAUFFMAN CA., BRADLEY SF.,** *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of our cases and review of the literature. Clin Infect Dis 1996; 23: 569-76.
29. **DUNNE WM Jr., MAISCH S.** Epidemiological investigation of infections due to *Alcaligenes* species in children and patients with cystic fibrosis: use of repetitive-element-sequence polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1995; 20: 836-41.
30. **DUPON M., WINNOCK S., ROGUES A.M., JANVIER G., DE BARBEYRAC B. & SARIC J.** *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia after liver transplantation [Letter]. Intensive Care Medicine, 1993, 19: 480.
31. **DURACK DT, BEESON PB.** 1972. Experimental bacteria endocarditis I. Colonization of a sterile vegetation. Br. J. E
32. **DWORZACK D.L., MURRAY C.M., HODGES G.R. & BARNES W.G.** Community-acquired bacteriemic *Achromobacter xylosoxidans* type IIIa pneumonia in a patient with idiopathic IgM deficiency. American Journal of Clinical Pathology, 1978, 70: 712-717.
33. **EL-SHAHAWY MA., KIM D., GADALLAH MF:** Peritoneal dialysis-associated peritonitis caused by *Alcaligenes xylosoxidans*. Am J Nephrol;1998; **18**: 452-455.
34. **FASS RJ., BARNISHAN J., SOLOMON MC., AYERS LW:** In vitro activities of quinolones, beta-lactams, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole against nonfermentative gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1412-1418.

35. **FERROIR J.P., MILLERON B., DENIS M; & GUILLARD A.** Un germe exceptionnellement à l'origine de méningites, *Achromobacter xylosoxidans*. La Presse Médicale, 1991, 20: 1090.
36. **FUDJII T., SATO K., INOUE M. & MITSUHASHI S.** Purification and properties of a B-lactamase from *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1987, 16: 297-304.
37. **GAHRN-HANSEN B, ALSTRUP P, DESSAU R, FUURSTED K, KNUDSEN A, OLSEN H, OXHØJ H, PETERSEN A. R, SIBONI A. AND SIBONI K.** Outbreak of infection with *Achromobacter xylosoxidans* from contaminated intravascular pressure transducers. Journal of Hospital Infection, 1988; 12: 1-6.
38. **GILARDI G.L.** Identification of glucose non-fermenting gram-negative bacilli *Clinical Microbiology Newsletter*, 1984, 6: 111-113.
39. **GLUPCZYNSKI Y., HANSEN W., FRENEY J. & YOURASSOWSKY E.** *In vitro* susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1988, 32: 276-278.
40. **GRADON JD., MAYRER AR., HAYES J.** Pulmonary abscess associated with *Alcaligenes xylosoxidans* in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1993, 17: 1071-2.
41. **GRANOWITZ EV, KEENHOLTZ SL.** A pseudoepidemic of *Alcaligenes xylosoxidans* attributable to contaminated saline. Am J Infect Control. 1998 ; 26(2):146-8.
42. **HAQQIE SS., ROTH M., BAILIE GR.** Unsuccessful treatment of CAPD peritonitis caused by *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. Ren Fail 1995; 17: 611-614.
43. **HEARN Y.R, M.D., AND RITA M. GANDER, PH.D.** *Achromobacter xylosoxidans* an unusual neo,atal pathogen. Am J Clin Pathol, 1991; 96: 211-214.
44. **HENDRIE M.S., HOLDING A.J. & SHEWAN J.M.** Emended descriptions of the genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that the generic name *Achromobacter* be rejected : status of the named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1974, 24: 534-550.
45. **HERNANDEZ JA, MARTINO R, PERICAS R, SUREDA A, BRUNET S, DOMINGO-ALBOS A.** *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia in patients with hematologic malignancies. Haematologica. 1998 Mar;83:284-5.
46. **HOFFKES HG, SCHMID EN.** Nosocomial infection by *Alcaligenes xylosoxidans* in neutropenic patients. Presse Med. 1995. 2-9 ; 24 : 1180.

47. **HOLMES B., SNELL J.J.S. & LAPAGE S.P.** Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material. *Journal of Clinical Pathology*, 1977, 30: 595-601.
48. **HOLDING A.J., SHEWAN J.M.** Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936AL. In, Buchanan R.E. & Gibbons N.E. (eds), *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8th ed, 1974, pp273-275. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
49. **HUANG NN, SCHILDLOW DV, SZATROWSKY TH, PALMER J, LARAYA-CUASAY LR, YEUNG W, HARDY K, QUITELL L, FIEL S.** Clinical features, survival rate, and prognostic factors in young adults with cystic fibrosis. *Am J Med*. 1987, 82(5):871-9
50. **HUGH, R. & LEIFSON, E.** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bact.*, 1953 ; 66: 24.
51. **HUGH L. MOFFET, M.D., AND TOMMY WILLIAMS.** Bacteria recovered from distilled water and inhalation therapy equipment. *Amer J Dis child*, 1967; 114: 7-12.
52. **HUSSON MO.** Aspects microbiologiques de la mucoviscidose. Dans : *Antibiotiques ; journal des agents anti-infectieux*. Ed.Masson. Déc.2002 : 211-224.
53. **HUTCHISON M.L., BONELL E.C., POXTON I.R., GOVAN R.W.** Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS immunology and Medical Microbiology*, 2000; 27: 73-77.
54. **IGRA-SIEGMAN Y., CHMEL H. & COBBS C.** Clinical and laboratory characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1980, 11: 141-145.
55. **ISHII, NAKAE.** Size of diffusion pore of *Alcaligenes faecalis*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 1988, 32: 378-384
56. **JAFFE A, FRANCIS J, ROSENTHAL M, BUSH A.** Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. 1998. *Lancet*, 351: 420
57. **KAY, CLARK, WHITE, PEEL.** Recurrent *Achromobacter piechaudii* bacteriemia in patient with hematological malignancy. *J. Clin. Microbiol.*. 2001. 39 : 808-810
58. **KIREDJIAN M., POPOFF M., COYNAULT C., LEFEVRE M. & LEMELIN M.** Taxonomie du genre *Alcaligenes*. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*, 1981, 132: 337-374.
59. **KNIPPSCHILD M., SCHMID EN., UPPENKAMP M., et al.** Infection by *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in neutropenic patients. *Oncology* 1996; 53: 258-62.

60. **KRZEWINSKI JW, NGUYEN CD, FOSTER JM, BURNS JL.** Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2001; 39(10):3597-602.
61. **LABRO MT.** Anti-inflammatory activity of macrolides : a new therapeutic potential ? J. Antimicrob. Chemother. 1998;41:37-46.
62. **LARSON EL.** Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. Am J Infect Control 1981;9:112-9
63. **LEGRAND C., ANAÏSSIE E.** Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in patients with cancer. Clinical Infectious Diseases, 1992, 14: 479-484.
64. **LEIFSON E. & HUGH R.** *Alcaligenes denitrificans* n.sp. Journal of General Microbiology, 1954, 11: 512-513.
65. **LEIFSON (E).** Atlas of bacterial flagellation. Academic press, 1960.
66. **LEVESQUE R., ROY P.H., LETARTRE R. & PECHERE J.C.** A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. Journal of Infectious Diseases, 1982, 145: 753-761.
67. **LEVESQUE R., LETARTRE R. & PECHERE J.C.** Comparative study of the beta-lactamase activity found in *Achromobacter*. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29: 819-826.
68. **LIN YH., LIU PY-F, SHI Z-Y, LAU Y-L, HU B-S.** Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in a burn unit. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28: 173-8.
69. **LIN A, DRIEBE WT JR, POLACK P.** *Alcaligenes xylosoxidans* keratitis post penetrating keratoplasty in a rigid gas permeable lens wearer. CLAO J. 1998 ; 24 : 239-41.
70. **LOEFGREN R.P., NELSON A.E. & CROSSLEY K.B.** Prosthetic valve endocarditis due to *Achromobacter xylosoxidans*. American Heart Journal, 1981, 101: 502.
71. **MAGROU, J. ET PREVOT, A.-R.** Ces Annales, 1948 ; 75 :99.
72. **MASLOW JN, SLUTSKY AM, Arbeit RD.** Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications. Eds, DH Persing, TR Smith, FC Tenover, and TJ White. Washington, DC : American society for Microbiology, p563-572.
73. **MANDELL W.F., GARVEY G.J. & NEU H.C.** *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia. Reviews of Infectious Diseases, 1987, 9: 1001-1005.

74. **MANDELL WF, GARVEY GJ, NEU HC.** *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia. Rev Infect Dis. 1987. 9: 1001-5.
75. **MARGARET M, HARRIS A. M., MARSHA LL M. J. and ROSS G. W.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. Journal of General Microbiology. 1975, 88 : 169-178.
76. **MARTINO R, GOMEZ L, PERICAS R, SALAZAR R, SOLA C, SIERRA J, GARAU J.** Bacteraemia caused by non-glucose-fermenting gram-negative bacilli and Aeromonas species in patients with haematological malignancies and solid tumours. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000. 19 : 320-3.
77. **MC GUCKIN M.B., THORPE R.J., KOCH K.M., ALAVI A., STAUM M. & ABRUTYN E.** An outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* related to diagnostic tracer procedures. American Journal of Epidemiology, 1982, 115: 785-793.
78. **MC MENAMIN, ZACCONE, COENYE, VANDAMME, LIPUMA.** Misidentification of *Burkholderia cepacia* in U.S. cystic fibrosis treatment centers : an analysis of 1051 recent sputum isolates. Chest 2000, 117 : 1661-1665.
79. **MENSAH K., PHILIPPON A., RICHARD C. & GRIMONT P.A.D.** Infections nosocomiales à *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* : sensibilité de 41 souches à 38 antibiotiques. Médecine et Maladies Infectieuses, 1989, 19: 167-172.
80. **MENSAH K., PHILIPPON A., RICHARD C. & NEVOT P.** Susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subspecies *xylosoxydans* to beta-lactam antibiotics. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1990, 9: 405-409.
81. **MIZUNOE S, YAMASAKI T, HIRAI K, YAMAGATA E, HIRAMATSU K, YAMAKAMI Y, NAGAI H, NASU M.** [Case report: subcutaneous abscess and thoracic empyema caused by *Alcaligenes xylosoxidans*] Kansenshogaku Zasshi. 1998. 72 : 631-4.
82. **MOFFRET H.L. & WILLIAMS T.** Bacteria recovered from distilled water and inhalation therapy equipments. American Journal of Diseases of Children, 1967. 114: 7-12.
83. **MORRISON AJ JR, BOYCE K 4TH.** Peritonitis caused by *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*: case report and review of the literature. J Clin Microbiol. 1986 ; 24 : 879-81.
84. **MOISSENET D, BACULARD A, VALCIN M, MARCHAND V, TOURNIER G, GARBARG-CHENON A, VU-THIEN H.** Colonization by *Alcaligenes xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. Clin Infect Dis. 1997 ; 24 : 274-5

85. **MOONEY L, KERR KG, DENTON M.** Survival of *Stenotrophomonas maltophilia* following exposure to concentrations of tobramycin used in aerosolized therapy for cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17 : 63-6
86. **MORRISON AJ Jr, BOYCE K :** Peritonitis caused by *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*: Case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 879-881.
87. **MORTENSEN JE, FISHER MC, LIPUMA JJ.** Recovery of *Pseudomonas cepacia* and other *Pseudomonas* species from the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995. 16:30-2.
88. **NIKAIDO H, NIKAIKDO K, HARAYAMA S.** Identification and characterization of porine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of biology chemistry*, 1991, 266: 770-779
89. **NAMNYAK S.S., HOLMES B. & FATHALLA S.E.** Neonatal meningitidis caused by *Achromobacter xylosoxydans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985, 22: 470-471.
90. **NEWMAN P., HILDER E., WARING G.O., HILL E.O., WILSON L.A. & HARBIN T.S.** Corneal ulcer due to *Achromobacter xylosoxidans*. *British Journal of Ophthalmology*, 1984, 68: 472-474.
91. **NGEOW Y.F. & PUTHUCHAERY S.D.** Antibiotic susceptibilities of *Achromobacter xylosoxidans*. *Singapore Medecine Journal*, 1985, 26: 519-522.
92. **NOTARANGELO, DUSE, UGAZAIO.** Immunodeficiency with hyper-IgM. *Immunodeficiency Rev* 1992 ; 3 :101-22
93. **PAN CH, WANG HZ, HSIEH KS, LIU YC.** *Alcaligenes xylosoxidans* neonatal meningitis: a case report. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 1996 ; 57 : 301-4.
94. **PERLMAN BB, FREEDMAN LR.** Experimental endocarditis. II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J. Biol.* 197. 44 : 206-213
95. **PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H., HASSE, G.** Persistent airway colonisation with *Alcaligenes xylosoxidans* i two brothers with cystic fibrosis. 1998.*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 132-134.
96. **PHILIPPON A., MENSAH K., FOURNIER G. & FRENEY J.** Two resistance phenotypes to β -lactams of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* in relation with β -lactamase types. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1990, 25: 698-700.
97. **PICHINOTY F., VERON M., MANDEL M., DURAND M., JOB C. & GARCIA J.L.** Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes* : *A. denitrificans* subsp. *denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978, 24: 743-753.

98. **PIEN F.D. & HIGA H.Y.** *Achromobacter xylosoxidans* isolates in Hawaii. Journal of Clinical Microbiology, 1978, 7: 239-241.
99. **RAHMAN MK, HOLZ ER.** *Alcaligenes xyl.* and *Propionib. acnes* postoperative endophthalmitis in a pseudophakic eye. AM J Ophtalmol 2000.129 :813-815
100. **RAJAN S, SAIMAN L.** Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. Semin Respir Infect 2002;17:47-56.
101. **RATJEN F, COMES G, PAUL K and al.** Effect of continuous antistaphylococcal therapy on rate of *P. Aeruginosa* acquisition in patient with cystic fibrosis. Pediatr pulmonol. 2001; 31: 13-6.
102. **REVERDY M.E., FRENEY J., FLEURETTE J., COULET M., SURGOT M., MARMET D. et al.** Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. Journal of Clinical Microbiology, 1984, 19: 140-143.
103. **RICARD C., BERTHELOT I. & GAUDEAU-TOUSSAINT M.F.** Septicémie à *Achromobacter xylosoxidans*. La Presse Médicale, 1991, 20: 521.
104. **ROLSTON K.V.I. & MESSER M.** The *in-vitro* susceptibility of *Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxidans* to 40 antimicrobial agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1990, 26: 857-860.
105. **SAIMAN L, CHEN Y, TABIBI S, SAN GABRIEL P, ZHOU J, LIU Z, LAI L, WHITTIER S.** Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2001;39(11):3942-5.
106. **SAIMAN L, CHEN Y, GABRIEL PS, KNIRSCH C.** Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1105-7
107. **SASAKI H, KAWAI H, SAWAMURA T, TAKIYA H.** A case report of aortic valve and VSD Dacron patch infective endocarditis. 1993. Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi 199
108. **SAN MIGUEL V.V., LAVERY J.P., YORK J.C. & LISSE J.R.** *Achromobacter xylosoxidans* septic arthritis in a patient with systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 1991, 34: 1484-1485.
109. **SCHOCH P.E. & CUNHA B.A.** Nosocomial *Achromobacter xylosoxidans* infections. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1988, 9: 84-87.
110. **SHIGETA S., YASUNAGA Y., HONZUMI K., OKAMURA H., KUMATA R. & ENDO S.** Cerebral ventriculitis associated with *Achromobacter xylosoxidans*. Journal of Clinical Pathology, 1978, 31:156-61.

111. **SHIGETA S., HYODO S., CHONAN E. & YABUUCHI E.** Serological classification of *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1983, 17: 181-186.
112. **SMITH, TRAVIS, GREENBERG, WELSH.** Cystic fibrosis airway fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996 Apr 19;85(2):229-36.
113. **SOUSSY C.J.** Associations d'antibiotiques. In *Bactéricidie, Aspects théoriques et thérapeutiques*. Courvalin, Drugeon, Flandrois, Goldstein. p.174-182.1990. Edition Maloine
114. **SPEAR J.B., FUHRER J. & KIRBY B.D.** *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source : case report and review of literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26: 598-599.
115. **TAN K, CONWAY S.P., BROWNLEE K.G., ETHERINGTON C., PECKHAM D.G.** *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 2002; 34:101-104.
116. **TANG S, CHENG CC, TSE KC, LI FK, CHOY BY, CHAN TM, LAI KN.** CAPD-associated peritonitis caused by *Alcaligenes xylosoxidans* sp. *Xylosoxidans*. *Am J Nephrol*. 2001; 21(6):502-6.
117. **THIBAUT P.** A propos d'*Alcaligenes faecalis*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1961, 100: 59-73.
118. **VALERIUS NH, KOCH C, HØIBY N.** Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991; 338: 725
119. **VANDAMME P, HEYNDRIKX M, VANCANNEYT M, HOSTE B, DE VOS P, FALSEN E.** *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:849-58.
120. **VU-THIEN H., DARBORD JC., MOISSENET D., DULOT C., DUFOURCQ JB, MARSOL P., GARBARG-CHENON A:** Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxydans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 724-726.

121. **VU-THIEN H, MOISSENET D, VALCIN M, DULOT C, TOURNIER G, GARBARG-CHENON A.** Molecular epidemiology of *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* in a cystic fibrosis center. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996 Nov;15(11):876-9.
122. **WEITKAMP JH, TANG YW, HAAS DW, MIDHA NK, CROWE JE JR.** Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia associated with persistent lymph node infection in a patient with hyper-immunoglobulin M syndrome. Clin Infect Dis. 2000;31(5):1183-7.
123. **WELK S.W.** *Achromobacter* pneumonia. The Western Journal of Medicine, 1982, 136: 349-350.
124. **WINTERMEYER SM., NAHATA MC.,** *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in children with chronic otorrhea. Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 114: 332-334.
125. **YABUUCHI E., YANO I., GOTO S., TANIMURA E., ITO T. & OHYAMA A.** Description of *Achromobacter xylosoxidans*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1974, 24: 470-477.
126. **YABUUCHI E. & YANO I.** *Achromobacter* gen. Nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. International Journal of Systematic Bacteriology, 1981, 31: 477-478.
127. **YABUUCHI E, OHYAMA A.** *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge. Jpn J Microbiol. 1971;15 : 477-81.
128. **YABUUCHI E, KAWAMURA Y, KOSAKO Y, EZAKI T.** Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. Microbiol Immunol. 1998;42:429-38.
129. **YABUUCHI E.** Twenty-seven years with the nomenclature of *Achromobacter xylosoxidans*. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 1999;10:1-12

LISTE des FIGURES

Liste des figures

- Fig. 1 :** Arbre phylogénétique (basée sur l'analyse de l'ADN ribosomal 16S) du genre *Achromobacter* et espèces associées (Liu, 2002)
- Fig. 2 :** Evolution schématique de quelques espèces des genres *Achromobacter* et *Alcaligenes*
- Fig. 3 :** *A. xylosoxidans*. Coloration de Gram. Dans : Atlas of bactériologie. Gestin, Goldstein, Acar. 1991. Ed. PIL.
- Fig. 4a :** vue de *A. xylosoxidans* en microscopie électronique à balayage (gross. x 15 000)
- Fig. 4b :** vue de *A. xylosoxidans* (en division) en microscopie électronique à balayage (gross. x 35 000)
- Fig. 5 :** Médianes de survie des patients atteints de mucoviscidose de 1940 à 1999.
- Fig. 6 :** Prévalence des bactéries inhabituelles retrouvées chez les patients mucoviscidosiques en fonction de l'âge (Beringer, 2000)
- Fig 7a :** Endocardite expérimentale de la valve aortique chez le lapin. Extraction de la carotide.
- Fig. 7b :** Endocardite expérimentale de la valve aortique chez le lapin. Le cathéter est introduit
- Fig 7c :** Endocardite expérimentale de la valve aortique chez le lapin. L'artère est ligaturée avec le cathéter
- Fig. 8 :** Test d'antagonisme entre la pipéracilline par la céfoxitine sur la souche 6
- Fig. 9a :** Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. Souche ATCC 27061
- Fig. 9b :** Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. Souche n°9
- Fig. 9c :** Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. Souche n°10
- Fig. 10a :** Test de synergie effectué sur la souche 10 par la méthode des disques.
- Fig. 10b :** Test de synergie effectué sur la souche 9 par la méthode des disques
- Fig. 11 :** Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 10.
- Fig. 12 :** Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 18.
- Fig. 13 :** Méthode des bandelettes effectuée sur la souche 11.

- Fig. 14a :** Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°10 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PC).
- Fig. 14b :** Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°18 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine, de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC)
- Fig. 14c :** Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°10 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine et de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC).
- Fig. 14d :** Vitesse de bactéricidie effectuée sur la souche n°11 comparant l'action la pipéracilline (P), de l'imipénème (I), de l'amikacine et de la ciprofloxacine (C) et de leurs associations (PI, PA, PC).
- Fig. 15 :** Schéma des différentes bandes ainsi que les profils obtenues par isoélectrofocalisation sur les 16 souches étudiées.
- Fig. 16 :** Détermination des points isoélectriques par isofocalisation.
- Fig. 17 :** Electrophorèse en champ pulsé effectuée chez 14 souches d'*A. xylosoxidans*
- Fig. 18 :** Dendrogramme effectué sur 13 souches parmi les 16 étudiées en plus de l'ATCC , à partir des profils de restriction obtenu après action de l'enzyme XbaI et après analyse par le logiciel GelCompar 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique).
- Fig. 19 :** Effet de la pipéracilline, l'imipénème et leur association in vivo sur la souche 10 d'*A. xylosoxidans*.

LISTE des TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau I :	Epidémies à <i>Achromobacter xylosoxidans</i> dans des services hospitaliers.
Tableau IIa-IIId :	Infections à <i>Achromobacter xylosoxidans</i>
Tableau III :	Diagnostic différentiel entre <i>A. xylosoxidans</i> et des espèces voisines.
Tableau V :	Nomenclature actuelle des différentes espèces du « complexe <i>cepacia</i> » (Husson, 2002)
Tableau VI :	Séries de patients atteints de mucoviscidose publiées dans la littérature.
Tableau VII :	Liste des patients intégrés dans l'étude.
Tableau VIIIa-VIIIb :	Sensibilité des 16 souches à 21 antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé
Tableau IX :	Valeurs des CMI (mg/l) de 7 bêta-lactamines vis-à-vis des 16 isolats cliniques et de la souche de référence ATCC 27061
Tableau X :	Comparaison de 3 régimes thérapeutiques <i>in vivo</i> : pipéracilline (PIP), imipénème (IPM), association pipéracilline-imipénème. Souche testée = <u>n°10</u> . Test de Scheffe après analyse de variance : a : $p < 0,05$ <i>versus</i> témoins.

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, le Directeur de l'U.E.R