

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des sciences

Département de Biochimie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Option : Microbiologie

THEME

Apport des quinolones et fluoroquinolones dans la lutte contre
les infections bactériennes

Présentée par : MERADI Laarem

Directeur de thèse : DJAHOUDI Abdelghani

Maître de conférences A

DEVANT LE JURY

Présidente : Abbaci Nafissa	Professeur	Université d'Annaba
Examineur : Benouareth Djamel	Professeur	Université de Guelma
Examinatrice : Kirane Djamila	Professeur	Université d'Annaba
Examineur : Kitouni Mahmoud	Professeur	Université de Constantine
Membre invité: Abdi Akila	Maître de conférences B	Université d'Annaba

REMERCIEMENT

Au nom de dieu clément et miséricordieux, le grand merci lui revient, de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes respectueux remerciements et toute ma gratitude à Dr Djahoudi A., mon promoteur pour la confiance et la bienveillance qu'il m'a témoignée et dont la disponibilité et l'indulgence m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je remercie vivement le professeur Abbaci N. d'avoir accepté de présider le jury et également Pr. Benouaret D., Pr. Kirane D. et Dr Kitouni M., pour l'honneur qu'ils m'ont rendu, en examinant mon travail.

Mes vifs remerciements vont pour Melle Abdi Akila, pour ses conseils éclairés dans l'orientation des travaux, ainsi que sa disponibilité et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Dr Timminouni M., et je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance, pour mon accueil dans son équipe et son aide précieuse dans mon travail.

Je remercie particulièrement Professeur Patrice Courvalin de l'unité des agents antibactériens de l'institut Pasteur de Paris, pour les souches de contrôles positifs utilisées dans cette étude ainsi que pour les protocoles des PCR BLSE, aac(6')-Ib et la PCR multiplex des gènes qnr.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Professeur Dakhil M., qui a largement participé à la réussite de ce travail et ainsi que les internes pharmaciens Dallel et Meriem pour leurs aide précieuse dans la collecte des souches.

Enfin, je remercie toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

LISTE DES TABLEAUX

Tab	Titre	Page
1	Différentes structures des quinolones	31
2	Relation structure/activité des quinolones	32
3	Classification des différentes générations de quinolones	35
4	Système d'efflux multidrogues <i>d'E.coli</i>	44
5	Caractéristiques épidémiologiques des variants de type Qnr	46
6	Origine des souches d'entérobactéries étudiées	52
7	amorces utilisées dans l'étude	58
8	Condition d'amplification par PCR	59
9	les ddNTP et leurs fluorochrome spécifique	61
10	Prévalence de la résistance des entérobactéries à l'acide nalidixique à annaba et à L'échelle nationale en 2007	67
11	Prévalence de la résistance des bactéries à Gram négatif non entérobactérie à la péfloxacin à annaba et à L'échelle national en 2007	67
12	Répartition des souches d'entérobactérie selon leurs phénotype de résistance aux quinolones .	69
13	Résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones	70
14	Résistance aux antibiotiques des souches de <i>Pseudomonas Spp</i> et d' <i>Acinetobacter Spp</i> résistantes aux quinolones	70
15	Les pourcentages de résistance aux quinolones par prélèvement	71
16	caractérisation des 26 souches résistantes à l'acide nalidixique	78
17	Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : <i>qnr</i> et leurs transconjugants	79
18	Résultats du séquençage des gènes	79

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	page
1	Cibles des principales familles d'antibiotiques	11
2	Représentation schématique des Mécanismes de transfert horizontal d'ADN chez les bactéries	28
3	Structure générale d'une quinolone	32
4	Structure schématique des cinq superfamilles de pompes d'efflux à antibiotiques.	43
5	Deux types de nucléotides triphosphates	61
6	Séquençage automatique avec des terminateurs fluorescents	63
7	Evolution de la résistance aux quinolones pendant la période d'étude	68
8	Antibiogramme de la souche S17: <i>Klebseilla pneumoniae</i> productrice de beta-lactamase à spectre étendue	73
9	Antibiogramme de la souche S14: <i>Enterobacter cloacae</i> productrice de beta-lactamase à spectre étendue	73
10	Antibiogramme de la souche S2: <i>Klebseilla pneumoniae</i> productrice de beta-lactamase à spectre étendue	74
11	Antibiogramme de la souche S4: <i>Proteus mirabilis</i> productrice de beta-lactamase à spectre étendue	74
12	Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche S 17: <i>Klebseilla pneumoniae</i>	76
13	Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche transconjugante Tc 17	76
14	Détection par PCR Multiplex du gène qnr à l'aide de trois couples d'amorces spécifiques du gène qnrA; qnrB; qnr S	80
15	Détection par PCR simplex du gène qnr à l'aide d'amorces spécifiques du gène qnrB; chez les souches qnr B positif et leurs transconjugants	80
16	Détection par PCR simplex du gène aac; chez les souches aac positif et les transconjugants des souches qnrB positif	81
17	Détection par PCR simplex du gène Tem chez les souches BLSE positif	82
18	Détection par PCR simplex du gène shv chez les souches BLSE positif	82
19	Détection par PCR simplex du gène Tem et shv chez les souches qnr positif et leurs transconjugants	83
20	Détection par PCR simplex du gène CTXM1, CTXM2, CTXM9 chez les souches BLSE positif et les transconjugants des souches qnr B positif	84
21	Profil plasmidique des souches qnr positives (S14 et S17) et leurs transconjugants	85

Liste des Abréviations

QRDR	Quinolone resistant determinant
AAC-(6')-Ib-cr	Aminoside Nacétyltransférase
FQ	Fluoroquinolone
Qep	Pompe d'efflux des quinolones
PMQR	Mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones
LPS	Lipopolysaccharide
ARNt	Acide ribonucléique transporteur
ADN	Acide desoxyribonucleique
PLP	Protéines liant la pénicilline
Ala	Alanine
EGF	Facteur d'élongation
GTP	Glucose triphosphate
pAB	Acide p-amino-benzoïque
DHFR	Dihydrofolate réductase
THF	Tétrahydrofolate
ATP	Adénosine triphosphate
BLSE	β lactamase à spèctre etendue
TMS	Segments transmembranaires
kb	Kilo paire de bases
ICE	Integrative Conjugative Element
IS	Séquences d'insertion
Tn	Transposons
IRR	Inverted repetitif region
RI	Resistant Integron
MRI	Multi-Resistance Integron
FAO	L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
OIE	L'organisation mondiale de la santé animale
OMS	L'organisation mondiale de la santé
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> méticillino-résistant
LCR	Liquide céphalorachidien
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
ORL	otorhinolaryngologie
G6PD	Glucose 6 phosphate déshydrogénase
MFS	Major facilitator superfamily
RND	Resistance nodulation division family
MATE)	Multidrug and toxic compound extrusion family
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CA-SFM	Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
dNTP	Désoxyribonucléique triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléique triphosphate
qsp	Quantité suffisante pour
PCR	Polymérase chaîne réactions
BET	Bromure d'ethidium
BHI	Brain hearth infusion
TBE	Tris Borate EDTA
BGN-NE	Bacilles à Gram négatif non entérobactéries
Tc	Transconjugante

Résumé

L'étude de la résistance des bacilles à Gram négatif aux quinolones au centre hospitalier universitaire d'Annaba a été réalisée sur une période allant du 1^{er} janvier 2004 à la fin décembre 2008.

On a ainsi, constaté une évolution assez inquiétante de cette résistance ; et afin de rechercher et de caractériser les mécanismes de résistance plasmidiques aux quinolones liés aux gènes *qnr* et *aac(6)'Ibc* ; 26 souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique ont été étudiées.

Les gènes *qnr*, *aac(6)'Ib*, TEM, SHV, CTX M, CMY, VEB et AmpC ont été recherché par PCR et caractérisé par séquençage. L'expérience de conjugaison et l'analyse du profil plasmidique ont été réalisés sur les souches *qnr* positif.

Parmi les 26 souches sélectionnées, 24 présentent une résistance à au moins 4 antibiotiques.

3 sur 26 souches sont porteuses du gène *aac(6)'Ib*, le variant *aac(6)'Ibc* a été détecté chez une seule souche. Seulement deux souches sont *qnr* positif et présentent aussi au moins deux types de gènes *bla* avec un haut niveau de résistance aux antibiotiques testés; les gènes *bla*, *qnr* et *aac(6)'Ib* ont été trouvé portés sur le même plasmide.

L'émergence de cette combinaison de gènes de résistance pose un vrai problème de santé publique. L'usage raisonné des quinolones est indispensable pour contrôler la diffusion de la résistance aux quinolones.

Mots clés : Infection – bactéries à Gram négatif - Quinolone - Résistance - plasmide- gène *qnr* - gène *aac(6)'Ib*

Abstract

The quinolone resistance study of Gram negative bacilli was assessed in the university hospital of Annaba from January 2004 to December 2008; resistant strains were characterised by the determination of their resistance phenotype.

The evolution of quinolones resistance during this study period is very worrying; in the aim of detection and characterization of new plasmidic mechanism of resistance to quinolones, due to *qnr* et *aac(6)'Ibcr* genes ; 26 strains of nalidixic acid resistant enterobacteria were studied .

The genes *qnr*, *aac(6)'Ib*, TEM, SHV, CTX M, CMY, VEB and AmpC were determined by PCR and characterized by sequencing . the *qnr*-positive isolates were studied by Conjugation experiments and the analyse of their plasmidic profiles.

24 of the 26 selected strains, were resistant to at least 4 antibiotics, 3 of 26 isolates were positif for the gene *aac(6)'Ib*; the variant *aac(6)'Ibcr* was detected only in one strain. Two strains were positive for *qnr* genes and were also positive for at least two *bla* genes and present a high resistance level to the tested antibiotics.

The genes *bla*, *qnr* and *aac(6)'Ib* were carried on the same plasmid.

the emergence of this association of resistance genes is a real problem of public health.

The reasoned use of the quinolones is essential to control the diffusion of this resistance.

Key words: infection- Gram negatif bacteria- Resistance - Quinolone - plasmid- gene *aac(6)'Ib* -gene *qnr*

المخلص

في هذا البحث تمت دراسة وبائية لظاهرة مقاومة البكتريا ذات الغرام سلبي للكينولونات في المركز الاستشفائي بعنابة لفترة ما بين جانفي 2004 الى نهاية ديسمبر 2008
لقد اظهرت النتائج تطور مقلق لهذه الظاهرة ولهدف دراسة الميكانيزمات الجديدة لهذه الظاهرة المتعلقة تمت بالجينات $Ib(6)'$ qnr, aac دراسة 25 سلالة من البكتيريا المعوية.
النتائج اظهرت ان 3 سلالات تحمل الجين $Ib(6)'$ aac و سلالتان تحملان الجين qnr و الجين aac $Ib(6)'$ تم إيجاده فقط في سلالة واحدة.
كما تبين ترافق هذه الجينات مع جينات أخرى لمقاومة مجموعات أخرى من المضادات الحيوية على نفس البلاسميد.
إن انتشار مثل هذه المجموعة من الجينات يمثل مشكل حقيقي للصحة العمومية. لذلك فان الاستعمال الرشيد للمضادات الحيوية أصبح ضروري جدا للحد من تفاقم المشكلة.

كلمات المفتاح: مقاومة, كينولونات, بلاسميد, الجين qnr , الجين $Ib(6)'$ aac

Dédicace

Avec joie et honneur, je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, toujours présents à mes besoins qu'ils puissent recevoir cette preuve d'amour et de gratitude pour leurs perpétuels dévouements, sentiments et d'encouragements.

*A mes chers frères et sœurs ainsi que mes belles sœurs et mes Beaux frères.
A mes adorables neveux et nièces*

A mes amies : Amel, Linda, Karima, Abla, Samia, Sihem, Asma, Yamina, Mehdi, Louisa.

Un grand merci à mon mari Hamou et ma belle famille pour leurs soutien moral et leurs encouragements perpétuelles.

Et enfin à mes deux adorables petits poussins : Abdou et Maïssoune

Sommaire

<i>Titre</i>	<i>Page</i>
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE 1 : LES ANTIBIOTIQUES	4
I. Définition	4
II. Les différentes cibles des antibiotiques.....	4
1. La paroi	4
2. La membrane : Formation de pores par les antibiotiques.....	5
3. Le ribosome : Inhibition de la synthèse protéique.....	6
4. L'ARN polymérase : Inhibition de la transcription.....	6
5. Les topoisomérases : Inhibition des réactions de modification de la topologie del'ADN.....	6
6. Inhibition de la synthèse de l'acide folique.....	7
III. Les principales familles d'antibiotiques et leurs modes d'action.....	7
1. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi.....	7
2. Familles d'antibiotiques ayant pour cible la membrane interne	8
3. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	9
4. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques.....	10
IV. Mécanismes de résistances aux antibiotiques.....	12
1. Résistance intrinsèque et acquise.....	12
2. Mécanismes non spécifiques de résistance.....	12
2.1 Perméabilité de la membrane externe.....	13
2.2 Efflux actif non spécifique.....	14
3. Mécanismes spécifiques de résistance.....	14
3.1 Inactivation de l'antibiotique.....	14
3.2 Modification et protection de la cible.....	18
3.3 Efflux spécifiques.....	19

V.	Mobilité et supports génétiques des gènes de résistance aux antibiotiques...	19
1.	Les transferts horizontaux de gènes de résistance	19
1.1	Transformation et compétence naturelle.....	20
1.2	Transduction.....	20
1.3	Conjugaison et mobilisation.....	21
2.	Supports génétiques des gènes de résistance	23
2.1	Chromosome et plasmide.....	24
2.2	Transposons.....	25
2.3	Intégrons.....	27
VI.	Resistance aux antimicrobien d'origine alimentaire.....	29
CHAPITRE 2 : LES QUINOLONES		30
I.	Définition	30
II.	Structure chimique	30
III.	Relation structure activité.....	32
IV.	Classification et spectre antibactérien.....	33
V.	Association avec d'autres antibiotiques.....	34
VI.	Pharmacologie.....	35
1.	Pharmacocinétique	35
1.1	Absorption et biodisponibilité.....	35
1.2	Fixation aux protéines plasmatiques et distribution.....	35
1.3	Demi vie et excrétion.....	35
2.	Pharmacodynamique.....	36
3.	Indications thérapeutiques	37
VII.	Mécanisme d'action des quinolones	37
1.	Cibles cellulaire	37
2.	Mode d'action	38
VIII.	Mécanisme de résistance aux quinolones	41

1. Résistance intrinsèque	41
2. Résistance acquise par mutation	41
2.1 Modification de la DNA-gyrase	41
2.2 Modification de la topoisomérase IV	42
2.3 La diminution de l'accumulation intra-bactérienne	42
3. La résistance plasmidique	44
3.1 Les déterminants de résistance de type Qnr.....	44
3.2 Inactivation des fluoroquinolones par l'acétyltransférase:	
AAC (6')-Ib-cr	47
3.3 Qep A : pompe d'efflux putative plasmidique FMS	47
IX. Résistance aux fluoroquinolones en médecine vétérinaire	48
PARTIE EXPERIMENTALE	49
CHAPITRE1: MATERIELS ET METHODES	49
I. Prévalence de la résistance aux quinolones dans la ville d'Annaba	49
II. Caractérisation moléculaire du support génétique de la résistance	51
1. Souches bactériennes.....	51
2. Sensibilité aux antibiotiques.....	51
3. Extraction de l'ADN Total.....	53
4. Dépistage du Gène <i>qnr</i> par La PCR Multiplex.....	53
5. Dépistage du Gène <i>aac (6')-Ib</i> par PCR.....	55
6. Dépistage des gènes de β - Lactamase et de <i>ampC</i> par PCR.....	56
7. Analyse des produits de PCR	56
8. Purification des produits PCR.....	57
9. Séquençage des produits PCR	59
10. Conjugaison et transfert de la résistance.....	64
11. Détermination du profil plasmidique.....	64
CHAPITRE 2: RESULTATS ET DISCUSSION.....	66
I. Prévalence de la résistance aux quinolones	66
II. Evolution de la résistance aux quinolones	68
III. Caractérisation du phénotype de résistance aux antibiotiques des souches résistantes aux quinolones	68

IV.	Etude de la résistance aux quinolones par prélèvement	71
V.	Etude de la résistance aux quinolones par service hospitalier.....	72
VI.	Caractérisation moléculaire des souches résistantes.....	72
	1. Analyse phénotypique des souches étudiées	72
	2. Mécanismes moléculaires de résistance aux quinolones.....	75
	3. Etude du transfert de la résistance aux quinolones	77
VII.	Discussion.....	86
CONCLUSION.....		90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....		92

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne.

Depuis leur première utilisation en 1942, les β -lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus largement développée et la plus diversifiée dans le monde. Cette utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et le faible coût de certaines molécules.

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes.

Le pouvoir d'adaptation des bactéries se manifeste par leur capacité à acquérir de nouvelles propriétés soit par modification de leur génome soit par gain d'information génétique nouvelle.

Pour faire face à ce phénomène, l'homme ne cesse de chercher de nouvelles molécules. Les quinolones sont des molécules synthétiques, découverte en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme.

Dans les années 80, la fluoruration de ces molécules en position 6, a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux cocci à Gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies. Ce qui a contribué à l'amélioration de l'apport de ce type de produit dans le traitement ; Parmi ces fluoroquinolones, on peut citer la ciprofloxacine, la lévofloxacine et la moxifloxacine.

Les quinolones ont pour cible les topo-isomérases, enzymes servant à enrouler et dérouler, nouer et dénouer le chromosome bactérien lors de la réplication et la transcription.

Du fait de leur bonne diffusion tissulaire, ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires.

La résistance aux quinolones était supposée être uniquement chromosomique, par sélection des souches mutantes.

Ces mutations affectent principalement le gène *gyrA*, puis le gène *gyrB* codant pour les sous-unité A et B de la DNA-gyrase.

L'analyse séquentielle de l'ADN bactérien montre que les mutations entraînant une résistance concernent fréquemment les acides aminés proche du site de fixation de la sous-unité GyrA (Tyr122 chez *Escherichia coli*) ; cette région est nommée QRDR, c'est la région déterminante pour la résistance aux quinolones (Yoshida et al, 1988 ; Yoshida et al ; 1990)

En 1998 où Martínez-Martínez *et al.* ont décrit la première souche (*Klebsiella pneumoniae*) dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252)

(Martinez-Martinez et al; 1998)

Il a été ensuite démontré que le plasmide pMG252 hébergeait le gène *qnrA* codant pour une protéine, QNR A, de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protège le complexe ADN-gyrase de l'inhibition par les quinolones (Hooper et al; 1999).

Quatre autres déterminants plasmidiques également impliqués dans la résistance aux quinolones ont été rapportés (*qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD*) ainsi que différents variants des protéines QnrA et QnrB (Wang et al, 2009 ; Poirel et al; 2005)

Un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches d'*Escherichia coli* isolées en Chine; Il s'agit d'une inactivation des FQ par acétylation au niveau de l'azote aminé du substituant pipérazinyl. Le déterminant de cette résistance est un variant d'une aminoside Nacétyltransférase ACC-(6')-Ib-cr dont le gène codant présente deux mutations spécifiques au niveau des codons 103 et 179 entraînant l'inactivation des FQ (Park et al;2006).

Un autre nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux fluoroquinolones a été découvert, par excrétion active des FQ via la pompe d'efflux *qepA*. (Perichon et al; 2007) (Yamane et al; 2007)

Les mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones (PMQR) conduisent à des résistances de bas niveau. Mais leur association aux mécanismes chromosomique augmente le niveau de résistance sous l'effet d'un traitement thérapeutique par les fluoroquinolones.

La co-expression d'autres gènes de multi-résistances par des souches porteuses de PMQR et leur déssimination en milieu hospitalier et dans la communauté est un facteur de risque d'impasse thérapeutique. Pour cette raison, l'étude et la caractérisation de ces mécanismes semblent nécessaires (guessend et *al*, 2008).

En Algérie, on assiste cette dernière décennie à une augmentation vertigineuse de la consommation des quinolones ; cependant, on ne dispose pas assez de données concernant leurs usages ainsi que leurs impacts dans le traitement des infections (communiqué d'OMS, 2008); dans ce contexte, ce travail a été entrepris afin :

- D'étudier de la prévalence de la résistance aux quinolones à Annaba
- Faire la caractérisation phénotypique des souches résistantes aux quinolones
- La recherche du support génétique de la résistance

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : LES ANTIBIOTIQUES

VII. Définition :

Les antibiotiques sont des molécules de bas poids moléculaire produites par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons, comme *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, etc. Ces substances d'origine naturelle exercent une toxicité sélective à des concentrations très faibles, non toxique pour l'hôte lors de traitement d'infections bactériennes.

Certains antibiotiques naturellement produits par des micro-organismes, ont été modifiés par synthèse chimique ou hémisynthèse permettant ainsi d'élargir leur spectre d'activité.

Les agents antibactériens obtenus par synthèse totale sont également assimilés à des antibiotiques. Cependant, le terme d'antibiotique est désormais utilisé pour désigner tout composé non toxique pour l'hôte et possédant une activité antibactérienne. (Christianne, 2000)

VIII. Les différentes cibles des antibiotiques

Les différentes familles d'antibiotiques interagissent avec des cibles spécifiques dans la bactérie. La figure 1 illustre les principales cibles des antibiotiques que sont la synthèse de la paroi, l'intégrité de la membrane, la synthèse protéique, la réplication de l'ADN, la transcription, et la synthèse de l'acide folique.

7. La paroi :

Les bactéries possèdent à l'extérieur de leur membrane cytoplasmique un polymère réticulé, le peptidoglycane, formé de longues chaînes osidiques linéaires portées par de courtes chaînes peptidiques. Cette structure, totalement absente chez les eucaryotes, participe au maintien de la forme de la cellule bactérienne et protège la membrane cytoplasmique des variations de la pression osmotique.

La synthèse du peptidoglycane est un processus complexe dont plusieurs étapes constituent des cibles pour des antibiotiques.

Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique; lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane; l'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane, il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie.

Les deux familles d'antibiotiques les plus importantes qui interfèrent avec la synthèse du peptidoglycane sont les β -lactamines et les glycopeptides, mais la cyclosérine, la bacitracine et la fosfomycine interviennent également à ce niveau.

(Walsh, 2003; Christian, 2000; Greenwood, 1995)

8. La membrane : Formation de pores par les antibiotiques

Les antibiotiques ayant pour cible la membrane interne des bactéries sont regroupés sous le terme général de peptides cationiques. La plupart de ces molécules interagissent avec les membranes bactériennes et perturbent la bicouche de phospholipides. Ils déstabilisent la membrane externe en se liant aux groupements phosphates des phospholipides et du lipopolysaccharide (LPS) et perméabilisent la membrane externe en déplaçant les cations divalents comme le magnésium et le calcium qui stabilisent les molécules de LPS entre elles. (Hancock, 1997 ; Zhang *et al*, 2000)

Le "principal" site d'action de ces molécules antibiotiques est la membrane interne où ils s'assemblent pour former des pores et ainsi conduire à la lyse de la bactérie.

La destruction subséquente de la membrane cytoplasmique, qui entraîne la fuite de composants internes essentiels (protéines et acides nucléiques) et la libération d'enzymes lytiques, est responsable de leur activité bactéricide.

Les polymyxines constituent la principale famille d'antibiotiques agissant sur les membranes.

9. Le ribosome : Inhibition de la synthèse protéique

Bien que considéré comme universel, le mécanisme général de la synthèse des protéines est suffisamment différent chez les bactéries et les cellules eucaryotes pour constituer une cible spécifique pour des agents antibactériens. L'activité sélective de ces agents est basée sur les différences structurales des ribosomes procaryotes et eucaryotes, qui concernent à la fois leur composante protéique et leur composante ribonucléique.

Ces différences sont reflétées entre autres par les coefficients de sédimentation des sous-unités ribosomales, 50S et 30S chez les bactéries et 60S et 40S chez les cellules eucaryotes.

L'inhibition de la synthèse protéique a lieu à différentes étapes selon les familles d'antibiotiques. (Walsh et al, 2003)

Les antibiotiques les plus importants de cette catégorie sont :

- **Les macrolides** : leur fixation au ribosome entraîne l'inhibition de l'élongation du peptide en formation.
- **Les phénicolés** : ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation bloquant ainsi la réaction de transpeptidation (Labro, 2002 ; Bryskier, 1995)

10. L'ARN polymérase : Inhibition de la transcription

L'ARN polymérase-ADN dépendante assure la transcription de l'ARN messager nécessaire à la synthèse des protéines.

Les antibiotiques de la famille des rifamycines bloquent la transcription de l'ADN bactérien en se fixant sur l'ARN polymérase bactérienne.

11. Les topoisomérases : Inhibition des réactions de modification de la topologie de l'ADN :

L'ADN gyrase et la topoisomérase IV régulent le degré de surenroulement négatif de l'ADN bactérien, qui est déterminant dans la réplication de l'ADN et dans la régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel.

Ce degré de surenroulement négatif est régulé physiologiquement en fonction des conditions environnementales de température, de pH et d'osmolarité. Les deux enzymes sont capables de séparer ou d'enlacer des ADN circulaires bicaténaires en réalisant une coupure simultanée sur les deux brins d'un des deux ADN, puis en faisant passer l'autre ADN à travers cette coupure.

Les antibiotiques de la famille des quinolones sont responsables de l'inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN.

Il est maintenant clairement établi que les quinolones exercent leur effet antibactérien en inhibant les topoisomérases de type II, c'est à dire l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, deux enzymes impliquées dans les modifications topologiques de l'ADN nécessaires au déroulement correct des processus de transcription, de réplication et de ségrégation du chromosome et des plasmides. (Luttinger, 1995)

12. Inhibition de la synthèse de l'acide folique.

Les inhibiteurs de la synthèse d'acide folique comme les sulfamides, les sulfones et l'acide para-amino-salicylique sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque avec lequel ils entrent en compétition lors de la synthèse d'acide folique qu'ils perturbent. Ils inhibent la dihydroptéroate synthétase, enzyme microbienne responsable de l'incorporation de l'acide para-aminobenzoïque dans l'acide dihydroptéroïque, précurseur de l'acide folique. (Mouton et *al*, 2000)

IX. Les principales familles d'antibiotiques et leurs modes d'action

5. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi

Les β -**lactamines**, parmi lesquelles on peut distinguer les pénicillines, les carbapénèmes, les monobactames et les céphalosporines, sont apparentées d'un point de vue stéréochimique au motif D-alanyl D-alanine, qui est un substrat de la dernière étape de synthèse du peptidoglycane, la réaction de transpeptidation.

D'une façon très schématique, les β -lactamines interagissent avec les sites catalytiques de plusieurs protéines enzymatiques, appelées PLP (Protéines liant la pénicilline), impliquées dans le métabolisme des pontages peptidiques du peptidoglycane.

Les **glycopeptides**, comme la vancomycine et la téicoplanine, inhibent les réactions de transglycosilation et de transpeptidation en se liant au motif D-alanyl-D-alanine des sous-unités du peptidoglycane transférées hors du cytoplasme, inhibant ainsi leur incorporation au peptidoglycane en cours de formation.

La vancomycine agit sur la synthèse du peptidoglycane en se liant à l'extrémité C-terminale du peptide pariétal natif au niveau du dipeptide D-Ala—D-Ala. Ainsi elle bloque le transport de ce peptide par l'undécaprényl phosphate et empêche l'action d'une transpeptidase qui relie les différents peptides du futur peptidoglycane entre eux. (Perichon, 1997)

Néanmoins, Il existe d'autres antibiotiques, la bacitracine, la cyclosérine, et la fosfomycine, agissant sur la paroi des bactéries, qui sont considérés comme "orphelins", car n'appartenant pas aux principales familles d'antibiotiques.

L'activité antibactérienne de la **bacitracine** réside dans sa capacité à inhiber la régénération du lipide C₅₅, qui reste alors dans la membrane cytoplasmique sous une forme biphosphorylée inutilisable.

La **Fosfomycine** inhibe la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, il se comporte comme un analogue de phosphoenolpyruvate ; son passage à travers la membrane cytoplasmique se fait par transport actif, une fois dans le cytoplasme elle se fixe sur l'enzyme pyruvyltransferase induisant ainsi l'arrêt de la synthèse de la paroi et la mort cellulaire. (Zhang et al, 2000)

6. Familles d'antibiotiques ayant pour cible la membrane interne :

Parmi les peptides cationiques, Les **polymyxines** constituent le seul groupe réellement considéré comme une famille d'antibiotiques agissant au niveau des membranes.

Les polymyxines sont constituées de 10 acides aminés dont 7 constituent un cycle, et d'un acide gras formant une extension hydrophobe. Cette structure originale explique que les polymyxines se comportent comme des détergents polycationiques.

Les polymyxines sont actives sur les bactéries à Gram négatif. La mort cellulaire bactérienne semble dans le cas de la polymyxine B être liée à la dépolarisation de la membrane cytoplasmique.

La polymyxine B est capable d'induire une fusion locale entre les membranes externe et interne et ainsi la formation de pores traversant les deux membranes. (Daugelavicius, 2000)

Les gramicidines représentent une autre famille de peptides cationiques actifs sur les bactéries à Gram positif. (Walsh, 2003)

7. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique

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

Les **aminosides** sont des antibiotiques à large spectre et généralement bactéricides. Le franchissement de la membrane cytoplasmique est un phénomène actif nécessitant un système transporteur d'électrons et de l'oxygène comme accepteur final.

Le mode d'action des aminosides a été bien étudié avec la streptomycine. Elle se fixe sur une région de la sous-unité 30S dont la configuration est due à plusieurs protéines (S12 mais aussi S4 et S5). Cette fixation provoque des erreurs de reconnaissance codons - anticodons et l'incorporation d'acides aminés erronés dans la chaîne peptidique en formation. D'autre part, la streptomycine empêche la fixation du facteur F3 qui, en fin de synthèse, provoque la dissociation du ribosome en ses deux sous-unités. De ce fait, les ribosomes sont "gelés" et incapables de s'unir à de nouveaux ARNm.

L'effet bactéricide des aminosides semble, en grande partie, être lié aux modifications structurales de la membrane cytoplasmique. (Bryskier, 1995)

Les **tétracyclines** forment une famille d'antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique à activité essentiellement bactériostatique. Elles pénètrent dans la bactérie principalement par un mécanisme actif grâce à des transporteurs qui les prennent en charge sous forme de chélates magnésiens.

Les sites précis de fixation des tétracyclines sur le ribosome prêtent à controverse. Il est généralement admis qu'elles interagissent avec la sous-unité 30S, par liaisons chélates établies avec les groupements phosphates des ARN messagers, empêchant ainsi l'aminoacyl-transférase d'atteindre le site accepteur.

Cependant, des effets bactéricides, attribués à la production de radicaux oxygénés sous l'effet de la lumière, ont été notés chez quelques espèces bactériennes. (Bahl et *al*, 2004)

Les **macrolides** se fixent au niveau de la sous-unité 50S et empêchent également la translocation du peptidyl-ARNt du site accepteur au site donneur, entraînant la dissociation de la chaîne peptidique en formation du ribosome. (Walsh, 2003)

L'**acide fusidique** est un antibiotique de nature stéroïdique et hydrophobe et donc actif uniquement sur les bactéries à Gram positif, notamment sur les staphylocoques. Il intervient au cours de la translocation et inhibe la phase d'élongation des synthèses peptidiques. Cette action semble liée à une stabilisation par l'acide fusidique d'un complexe ribosome-facteur d'élongation, complexe qui doit normalement se dissocier après la translocation du peptide. (Thierry, 2000)

8. Familles d'antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

Les **quinolones** sont des agents antimicrobiens dont le premier représentant utilisé en thérapeutique ; Les améliorations les plus significatives en termes d'activité ont été apportées par des substitutions par un atome de fluor (donnant naissance aux quinolones de deuxième génération, dont la fluméquine) et par un noyau pipérazine. Ces deux modifications combinées caractérisent le groupe des **fluoroquinolones**, dont un des représentants les plus utilisés en médecine humaine est la ciprofloxacine.

L'ADN gyrase est la cible la plus anciennement identifiée des quinolones. (Larouche, 2001)

La **rifampicine** est le principal composé de la famille des rifamycines. Active à très basse concentration sur les ARN polymérase bactériennes, elle n'a aucun effet sur leurs équivalents eucaryotes. L'inhibition est due à sa fixation sur la sous-unité β de cette enzyme qui catalyse la synthèse des liaisons phosphodiester. L'effet bactéricide de la rifampicine pourrait être lié également à la production de radicaux libres en présence d'oxygène.

Les **sulfamides** interfèrent avec une étape précoce de la synthèse de l'acide folique, la condensation par la dihydroptéroate synthétase de l'acide p-amino-benzoïque (pAB), dont ils sont des analogues structuraux, avec la dihydroptéridine, qui donne naissance à l'acide dihydroptéroïque. Les intermédiaires réactionnels ainsi formés par condensation avec les sulfamides sont inutilisables pour les réactions ultérieures conduisant aux folates.

Le **triméthoprim**, analogue de la pyrimidine, inhibe puissamment la synthèse par la dihydrofolate réductase (DHFR), de la forme active des folates, le tétrahydrofolate (THF). Les sulfamides et le triméthoprim sont le plus souvent utilisés en combinaison. (Walsh, 2003)

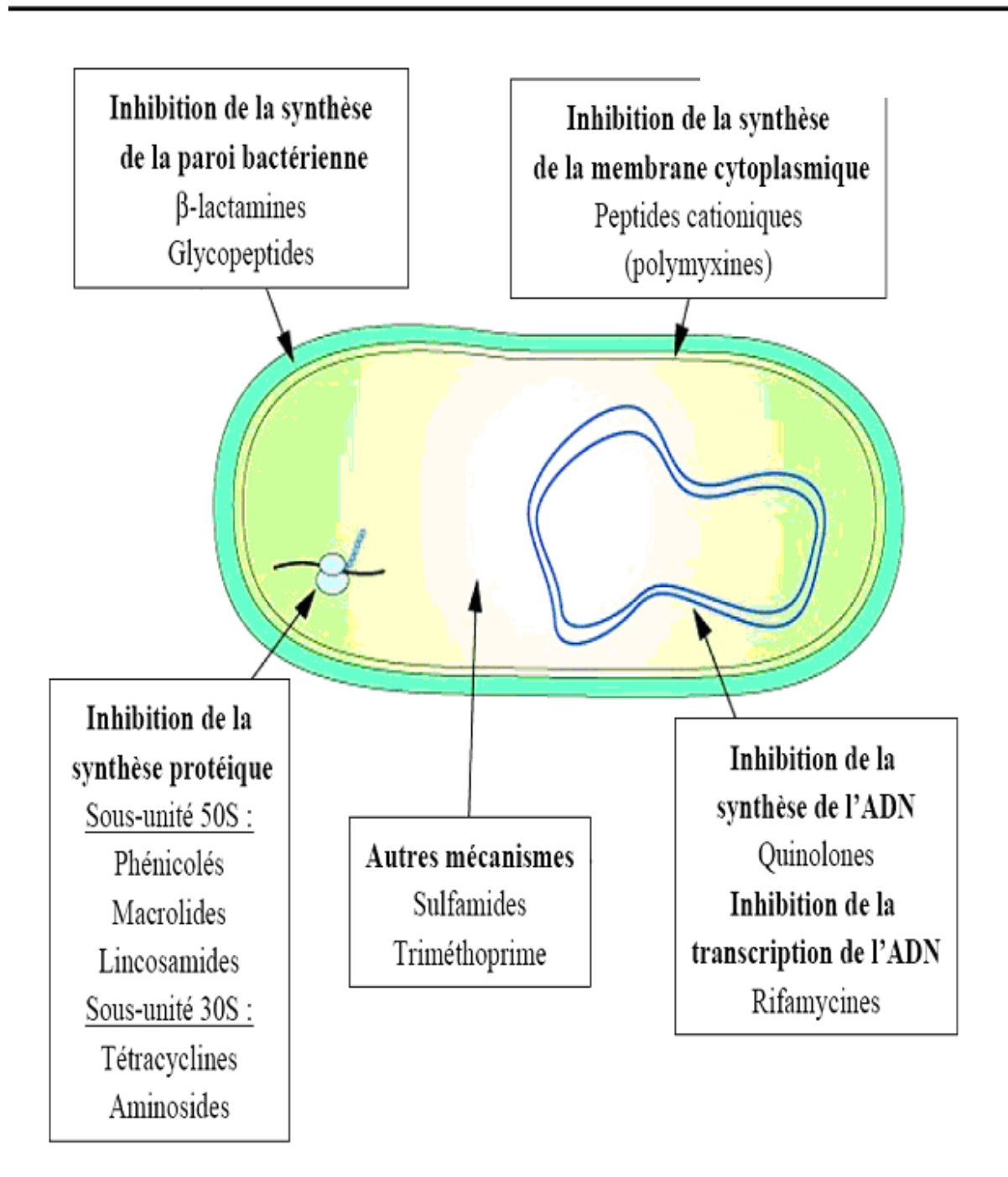


Fig 1 : Cibles des principales familles d'antibiotiques (Mingeot-Leclercq, 1999)

X. Mécanismes de résistances aux antibiotiques

"Une bactérie est considérée comme résistante à un antibiotique quand la concentration de cet antibiotique au site de l'infection n'est pas suffisamment élevée pour inhiber la multiplication de cette bactérie ou pour la tuer". (Schwarz *et al*, 2001)

4. Résistance intrinsèque et acquise

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce.

Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactive.

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un antibiotique. Dans ce cas, **La résistance acquise** est présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation (Chopra *et al*, 2003) ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (Davies, 1997)

Certains mécanismes confèrent spécifiquement une résistance à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques. D'autres mécanismes présentent une spécificité d'action plus faible et peuvent donc conférer une résistance à de nombreux composés toxiques non apparentés, comprenant non seulement des antibiotiques, mais aussi des solvants organiques ou des détergents. (Chaslus-Dancla *et al*; 2002)

5. Mécanismes non spécifiques de résistance

La résistance bactérienne non spécifique peut concerner plusieurs molécules ou familles d'antibiotiques. Comme dans le cas de la résistance intrinsèque, une modification de la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif peut jouer un rôle déterminant dans la résistance à certains antibiotiques. Le second mécanisme majeur de résistance non spécifique est l'efflux actif des antibiotiques par des pompes dites "multidrogues". (Christianne, 2000)

2-1 Perméabilité de la membrane externe

Deux composants principaux déterminent la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif : le LPS et les porines.

Contrairement à la membrane cytoplasmique, la membrane externe présente une très grande dissymétrie. Tandis que la monocouche interne est composée de phospholipides, essentiellement de phosphatidyl-éthanolamine, la monocouche externe est constituée de glycolipides : les lipopolysaccharides, ou LPS.

La caractéristique principale du LPS intervenant dans son rôle de barrière sélective aux agents du milieu externe est son importante charge négative.

La surface polyanionique formée par le LPS est partiellement neutralisée par des cations divalents comme Mg^{2+} ou Ca^{2+} , qui stabilisent les molécules du LPS. La capacité de certaines molécules, dont des antibiotiques, de chélater ces ions, est déterminante pour leur pénétration à travers la membrane externe. (Putman et *al*, 2000)

Les porines sont des protéines qui forment des canaux permettant la diffusion à travers la membrane externe de petites molécules hydrophiles.

Le mode de pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe dépend de leur poids moléculaire, mais aussi de leur hydrophobicité et de leur charge. Les composés hydrophiles diffusent rapidement au travers de la membrane par la voie des porines.

Au contraire, la membrane externe constitue une barrière d'exclusion très efficace contre les antibiotiques hydrophobes. Cette imperméabilité est probablement due à la stabilisation des molécules de LPS par des cations divalents, qui limite l'accès des antibiotiques hydrophobes à la partie interne hydrophobe de la membrane. (Mingeot-Leclercq, 1999)

Un troisième mode de pénétration, dit "auto-promu" est décrit pour les antibiotiques polycationiques, comme les aminosides et les peptides cationiques. Ces composés sont capables de déstabiliser la membrane en prenant la place des cations divalents, et favoriser ainsi leur propre diffusion à travers la bicouche lipidique, ainsi que celle d'autres molécules hydrophobes. (Hancock, 1997)

2-2 Efflux actif non spécifique

En dépit de sa faible perméabilité, la membrane externe des bactéries à Gram négatif ne peut que ralentir la pénétration des antibiotiques. L'efflux actif intervient de façon à maintenir à un niveau sub-inhibiteur les concentrations intracellulaires des antibiotiques.

La résistance intrinsèque générale des bactéries à Gram négatif est déterminée par la présence de pompes à large spectre de substrats, dites "multidrogues". (Paulsen et *al*, 1996 ; Putman et *al*, 2000)

Les pompes d'efflux multidrogues sont classées selon trois critères : la source d'énergie qu'elles utilisent, leur phylogénie, et leur spectre de substrats.

Les transporteurs dits "primaires" utilisent comme principale source d'énergie l'ATP. Tandis que les transporteurs dits "secondaires" fonctionnent par symports ou antiports.

Les transporteurs secondaires sont prédominants chez les bactéries à gram négatif. (Poole, 2004)

6. Mécanismes spécifiques de résistance

Il existe trois mécanismes majeurs impliqués dans la résistance spécifique aux antibiotiques : l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la protection, la modification ou le remplacement de la cible et puis l'efflux spécifique de l'antibiotique. (Christianne, 2000)

3-1 Inactivation de l'antibiotique

De nombreuses enzymes sont connues pour inactiver les antibiotiques. Certaines enzymes détruisent directement la molécule d'antibiotique, et d'autres se contentent d'inactiver l'antibiotique en ajoutant sur la molécule différents groupements chimiques. Le spectre de ces enzymes est généralement limité à une famille d'antibiotiques voire uniquement à certaines molécules d'une famille.

La résistance aux β -lactamines est due principalement à l'existence de β -lactamases, enzymes capables de scinder le noyau β -lactame commun à l'ensemble des molécules de cette famille. Les β -lactamases sont nombreuses, elles sont classées actuellement en fonction de leurs substrats, ainsi que de leur sensibilité aux inhibiteurs des β -lactamases. (Paterson *et al*, 2005).

On distingue entre autre les pénicillinases et les céphalosporinases (Towner, 1995) Étant donné que plus de 340 β -lactamases uniques ont été décrites, il est important d'adopter un système de classification simple qui reflète la fonction et la similarité des séquences de protéines

La classification d'Amber divise les β -lactamases en 4 groupes sur la base de leur séquence d'acides aminés.

- Classe moléculaire A (comprenant les familles TEM, SHV et CTX-M)
- Classe moléculaire B comprend des métallobêta-lactamases
- Classe moléculaire C (AmpC)
- Classe moléculaire D (OXA)

Les caractéristiques importantes sont que les enzymes de classe A sont inhibées par l'acide clavulanique et d'autres inhibiteurs des β -lactamases commercialisés et ne sont pas actives contre les céphamycines, alors que les enzymes de classe C (AmpC) ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique et sont actives contre les céphamycines.

Aucune des deux classes n'est active contre les carbapénèmes. Par opposition, les métallobêta-lactamases (Classe B) sont généralement actives contre les carbapénèmes et contre d'autres β -lactamines. Elles ne sont pas inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases commercialisés et sont responsables de la résistance de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Aeromonas sp* aux carbapénèmes. Habituellement (mais pas toujours), un nom en trois lettres se réfère à une famille de β -lactamases génétiquement liées, le chiffre indiquant l'enzyme spécifique (p. ex. TEM10). (Bush *et al*, 1995)

La plupart des BLSE appartiennent aux familles TEM (TEM3-133), SHV (SHV-2-54), CTX-M (CTX-M1-28) groupes 8. Il existe une nomenclature similaire pour les enzymes plasmidiques AmpC appelées CMY, MIR, FOX, ACT, ACC, etc.

Des carbapénémases plasmidiques ont également été identifiées, en particulier en Extrême-Orient, les plus courantes étant les groupes IMP et VIM. Les bêta-lactamases OXA ont été identifiées généralement dans *Pseudomonas aeruginosa* à laquelle elles confèrent une résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline, et la ceftazidime qui n'est pas inhibée par l'acide clavulanique. Elles ont été associées à la résistance aux carbapénèmes, mais seulement dans *Acinetobacter sp.*,

probablement du fait que les organismes ont une faible perméabilité aux carbapénèmes, permettant aux enzymes ayant une faible activité de produire une résistance cliniquement significative. (Guiney *et al*, 1993)

Les gènes des BLSE de type TEM et SHV sont issus de leurs précurseurs (gènes TEM1 ou 2 ou SHV-1) par plusieurs mutations ponctuelles qui confèrent une résistance aux oxyiminocéphalosporines, aux monobactames et aux pénicillines, mais non aux céphamycines (céfoxitine, céfotétane) ou aux carbapénèmes.

Cette résistance est inhibée par les inhibiteurs des β -lactamases –l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Les BLSE sont donc spécifiquement définis comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération et ont été inhibées par l'inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique.

Le taux d'hydrolyse des différentes β -lactamines varie d'une enzyme à une autre et les souches de *E. coli* produisant des BLSE peuvent être sensibles au ceftazidime et résistantes au céfotaxime, ou vice-versa. Par exemple, les enzymes CTX-M identifiées dans une étude de population à Calgary préfèrent le céfotaxime/ceftriaxone comme substrat.

Par opposition, une épidémie de cas d'infection par *Klebsiella* produisant des BLSE à Chicago a été causée par un mutant de la bêta-lactamase TEM qui hydrolyse de préférence la ceftazidime. De plus, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'une bêta-lactamine peuvent varier dans différentes souches porteuses de la même BLSE en raison de la présence d'autres bêta-lactamases et/ou de l'altération de la perméabilité de la membrane. (Canton *et al*, 2006)

Les bêta-lactamases AmpC ne sont pas inhibées par les inhibiteurs des bêta-lactamases commercialisés et confèrent une résistance aux pénicillines, aux monobactames, aux (oxyimino)-céphalosporines de troisième génération et aux céphamycines, mais non aux carbapénèmes. Le type de résistance est principalement déterminé par le degré d'expression. Le gène chromosomique *ampC* codé peut produire constitutivement des bêta-lactamases à un taux faible ou élevé ou leur production peut être inductible¹. *E. coli* possède un gène *ampC* qui n'est pas inductible et est exprimé à des taux non significatifs. *E. coli* est donc sensible à toutes les bêta-lactamines et demeure sensible aux oxyimino-céphalosporines lorsqu'il produit les enzymes TEM-1 ou SHV-1, car il a acquis les gènes respectifs situés sur un plasmide.

(Philippon *et al*, 2002)

Dans *Enterobacter cloacae*, l'expression du gène *ampC* est inductible par les bêta-lactamines. La présence d'une bêta-lactamine entraîne des produits de dégradation de la paroi cellulaire qui convertissent l'AmpR d'un répresseur en un inducteur de l'expression du gène *ampC*, entraînant la régulation positive de la production de bêtalactamase AmpC. Et surtout, des mutations peuvent se produire au locus *ampD*, qui est responsable du recyclage des produits de dégradation de la paroi cellulaire, et les mutants du gène *ampD* (mutants dérégulés) produisent constamment des taux élevés d'AmpC. (Gu et al, 2004)

Les hyperproducteurs d'AmpC sont généralement résistants à toutes les céphalosporines de troisième génération, aux céphamycines, aux carboxy-pénicillines, aux ureidopénicillines et aux associations de bêtalactamine et d'inhibiteurs des bêta-lactamases, mais demeurent sensibles aux carbapénèmes. Cependant, l'hyperproducteur *P. aeruginosa* (et moins fréquemment *E. cloacae*) peut devenir résistant en raison de modifications de la porine, une protéine de la membrane extérieure, qui réduisent l'entrée des carbapénèmes.

Les gènes *ampC* ont été localisés également dans les plasmides, probablement par la capture des gènes chromosomiques *ampC*. Cela entraîne l'expression constitutive de la bêta-lactamase AmpC à des taux modérément élevés, et le même phénotype extrêmement résistant présents dans les mutants constitutifs. (Liassine, 2000)

L'inactivation enzymatique des **aminosides** est réalisée par modification enzymatique de l'antibiotique. Il existe trois classes d'enzymes différentes classées en fonction du radical qu'elles ajoutent à la molécule d'aminoside : les N-acétyltransférases (AAC), les O-nucléotidyltransférases (ANT), et les O-phosphotransférases (APH).

Il existe un grand nombre d'enzymes de modifications des aminosides classées en fonction du radical qu'elles ajoutent puis de la position modifiée sur la molécule, ainsi qu'en fonction de leur spectre d'activité sur les aminosides. (Shaw et al, 1993)

La résistance au **chloramphénicol** est également liée à la production d'enzymes, les chloramphénicols acétyl transférases (CAT), responsable de l'acétylation du Chloramphénicol.

3-2 Modification et protection de la cible

Un autre mécanisme à l'origine de la perte d'activité de l'antibiotique est la modification de sa cible. Lorsque celle-ci est une protéine, la modification est le plus souvent la conséquence de la présence d'une ou de plusieurs mutations dans le gène correspondant. La modification, la protection ou le remplacement de la cible de l'antibiotique est un mécanisme qui intervient dans la résistance à de nombreuses familles d'antibiotiques.

Le mécanisme majeur de résistance aux **quinolones** est l'altération des enzymes cibles que sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV.

La résistance aux **glycopeptides**, étudiée chez les entérocoques, est un cas particulier de résistance par modification de la cible. L'acide aminé D-Ala qui interagit avec les glycopeptides, est incorporé au précurseur du peptidoglycane sous forme d'un dipeptide par une D-Ala-D-Ala ligase. Les entérocoques résistants produisent une ligase structurellement proche de celle qui synthétise le dipeptide D-Ala-D-Ala à la seule différence, qu'elle produit un "dépsipeptide" D-Ala-D-Lactate qui remplace le dipeptide.

Un "dépsipeptide" est formé par une liaison ester entre un acide aminé et un sucre, pour cette raison la fixation de la vancomycine s'effectue avec une affinité très diminuée.

Cette modification a pour conséquence la diminution de la fixation de la vancomycine sur la sous-unité du peptidoglycane. (Perichon et *al*, 1997)

Les résistances aux sulfamides et triméthoprime sont dues à des variants des enzymes cibles, dihydroptéroate synthétase et dihydrofolate réductase, respectivement insensibles aux sulfamides et au triméthoprime. Dans le cas des macrolides et lincosamides, il existe également des enzymes (ARN méthylases) capables de modifier l'ARN ribosomal 23S, cible de ces antibiotiques. Cette méthylation confère à la bactérie une résistance croisée aux macrolides, lincosamide et streptogramines du groupe B appelée résistance de type MLS. (Walsh, 2003)

3-3 Efflux spécifiques

Les systèmes d'efflux spécifiques exportent principalement un spectre étroit de molécules apparentées en dehors de la cellule bactérienne par un système énergie dépendant.

L'exemple le plus étudié est celui des pompes spécifiques des **tétracyclines**. L'efflux actif des tétracyclines est réalisé par deux types de transporteurs appartenant à la famille MF

Ces protéines transmembranaires échangent un proton contre un complexe tétracycline-cation. Le premier groupe de transporteurs qui est constitué de 12 segments transmembranaires (12 TMS) est essentiellement retrouvé chez les entérobactéries, *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Vibrio*. Le second type de transporteurs à 14 TMS est principalement présent chez les bactéries à Gram positif. Il existe également des pompes d'efflux spécifiques de la famille des **phénicolés**, notamment du chloramphénicol et florfénicol. (Schwarz et *al*, 2001)

XI. Mobilité et supports génétiques des gènes de résistance aux antibiotiques

3. Les transferts horizontaux de gènes de résistance :

Les transferts horizontaux de gènes jouent un rôle important dans la dissémination des mécanismes de résistance aux antibiotiques entre espèces bactériennes. Ils repoussent les limites liées à la transmission verticale des gènes et des mutations pendant la division cellulaire. Pour que le transfert horizontal de matériel génétique soit efficace, plusieurs étapes sont nécessaires : l'ADN, support de l'information génétique, doit être transféré de la cellule donneuse à la cellule réceptrice (étape intercellulaire) ; la séquence ADN doit s'intégrer soit au génome (chromosome), soit sur une structure se répliquant de façon autonome (plasmide) ; les gènes apportés par ce fragment d'ADN doivent ensuite être capable de s'exprimer dans la cellule réceptrice.

Les bactéries utilisent trois mécanismes principaux de transfert horizontal d'éléments génétiques entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces et de genres différents : la transformation, la transduction et la conjugaison. (Davison, 1999)

1-1 Transformation et compétence naturelle :

La transformation naturelle est un mécanisme d'acquisition d'ADN par certaines espèces bactériennes capables au cours de leur cycle cellulaire de présenter un état physiologique appelé état de compétence, nécessaire à la fixation et l'absorption d'ADN par ces bactéries. Plusieurs espèces, comme *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* présentent un haut niveau de transformation dans certaines conditions physiologiques de leur cycle cellulaire. (Dubnau, 1999)

D'autres espèces comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* sont perpétuellement en état de compétence. (Lorenz et al, 1994)

Il est possible pour des espèces bactériennes non transformables naturellement comme *E. coli* et *Salmonella* d'acquérir l'état de compétence après certains traitements chimiques ou physiques. (Davison, 1999)

La transformation nécessite la présence dans le milieu environnant d'ADN libre provenant d'une cellule bactérienne lysée. L'ADN libéré est ensuite fixé et absorbé par une bactérie réceptrice en phase de compétence. Pour les espèces bactériennes comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae*, l'efficacité de la transformation est accrue par la présence de séquences ADN reconnues et également présentes dans leurs génomes. (Dutta et al, 2002)

Dans la bactérie réceptrice, l'ADN exogène subit ensuite une recombinaison génétique afin de s'intégrer de façon stable au génome bactérien et d'être transmis aux cellules-filles.

La limite principale de ce mécanisme est l'insertion du fragment d'ADN exogène, elle nécessite une importante similarité nucléotidique avec l'ADN de la cellule réceptrice. La transformation jouerait un rôle limité dans les transferts horizontaux de gènes de résistance car l'ADN libre dans l'environnement est rapidement dégradé et les espèces bactériennes naturellement compétentes sont peu nombreuses (Schwarz, 2001)

1-2 Transduction

Le transfert horizontal de gènes par transduction est réalisé par l'intermédiaire des bactériophages. Le transfert d'ADN a lieu entre bactéries reconnues par le même phage. Lors de l'encapsidation, le bactériophage incorpore de l'ADN bactérien fragmenté. La transduction est dite généralisée lorsque le bactériophage est capable d'encapsider les fragments d'ADN générés lors de la lyse bactérienne.

Certains bactériophages présentent une transduction dite spécialisée, c'est-à-dire que seuls les gènes proches du site d'intégration du prophage peuvent être encapsidés et transférés à une autre bactérie. Certains bactériophages semblent coder des facteurs de virulence qui peuvent s'exprimer lorsque le phage est lysogénisé dans la bactérie. Cette situation a notamment été décrite pour certaines shiga-toxines chez *E. coli* O157 : H7. La limite de ce mécanisme de transfert vient principalement de la spécificité d'hôte des bactériophages qui, étant étroite, ne permet qu'une

dissémination limitée d'information génétique. De plus, la taille de l'ADN bactérien encapsidé est limitée en raison de la taille du bactériophage, et ne peut généralement pas dépasser 50 kb. Pour ces différentes raisons, la transduction apparaît comme un mécanisme probablement plus efficace pour le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques. (Davison, 1999)

1-3 Conjugaison et mobilisation

La conjugaison est le mécanisme le plus fréquent de transmission d'ADN entre bactéries et probablement le plus efficace. (Clewell, 1993)

La conjugaison nécessite un contact étroit entre bactéries dites de sexe différent par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique permettant le transfert unidirectionnel d'ADN de la cellule donneuse vers la cellule réceptrice.

Le transfert de l'ADN de la bactérie donneuse à la bactérie réceptrice s'effectue sous forme simple brin. Il est possible de différencier plusieurs types de conjugaison.

L'exemple le plus classique est le transfert des **plasmides conjugatifs** (Tra+) apparentés au plasmide F, premier plasmide connu, de *E coli*. Les plasmides sont des éléments d'ADN extra-chromosomique capables de se répliquer de façon autonome dans la bactérie-hôte.

Les plasmides conjugatifs possèdent l'information génétique (fonction Tra) nécessaire à leur propre transfert d'une bactérie à une autre. Les fonctions Tra interviennent dans la synthèse des pili, dans la stabilisation de l'agrégation, dans le transfert de l'ADN simple brin, dans l'exclusion de surface, ainsi que dans la régulation de l'ensemble du processus.

L'ensemble de ces fonctions de conjugaisons sont localisées dans une région d'environ 30 kb sur les plasmides conjugatifs. Les plasmides sont classés sur la base de groupes d'incompatibilité (groupe Inc) ; deux plasmides du même groupe d'incompatibilité ne peuvent exister de manière stable dans la même bactérie-hôte. (Ippen-Ihler et al, 1993)

Certains plasmides non-conjugatifs (Tra-, Mob+) ne possèdent pas les fonctions de Transfert, et ne peuvent donc pas s'auto-transférer d'une bactérie à l'autre. Cependant le transfert de ces plasmides non-auto-transférables peut être réalisé par l'intermédiaire d'un second plasmide conjuguatif. Les plasmides (Tra-, Mob+) sont dits **mobilisables** car ils contiennent une origine de transfert (*oriT*). (Davison, 1999) (Dutta et al, 2002) Les plasmides mobilisables IncQ contiennent

une région (Mob) qui est formée de l'*oriT* ainsi que des gènes *mob* impliqués dans le relaxosome permettant l'initiation du transfert de l'ADN simple brin. (Guiney, 1993)

Dans la plupart des cas, le plasmide conjugatif n'est pas transféré en même temps que le plasmide mobilisable. (Davison, 1999)

Certains plasmides non-conjugatifs et non mobilisables (Tra-, Mob-) peuvent former un co-intégrat avec un plasmide conjugatif. La **co-intégration** permet alors aux deux plasmides d'être transférés en bloc par conjugaison. La résolution du co-intégrat a ensuite lieu dans la cellule réceptrice après le transfert. Le transfert de gènes chromosomiques des bactéries Hfr (Haute fréquence de recombinaison) représente une forme spécialisée de co-intégration dont l'exemple le plus connu est celui du plasmide F d'*E. coli*. La conjugaison est également impliquée dans le transfert horizontal des **transposons conjugatifs**. Ces transposons présents sous forme intégrée au chromosome sont capables de s'exciser pour former une molécule circulaire non-répliquative. Cette forme circulaire des transposons conjugatifs peut alors être transférée par conjugaison à une cellule-hôte. (Churchward, 2002)

Le transposon ainsi transféré est ensuite inséré dans le chromosome de la cellule-hôte au niveau d'une nouvelle cible plus ou moins spécifique selon les transposons. Les transposons conjugatifs ont été largement étudiés chez les bactéries Gram positif comme *Bacteroides* et *Streptococcus*. (Pembroke et al, 2002)

Des éléments conjugatifs et intégratifs ont été décrits chez plusieurs bactéries Gram négatif comme *Salmonella*, *Vibrio* et *Proteus* cependant le terme de transposon ne semble pas être le plus approprié pour ce type d'élément. Le terme d'ICE (Integrative Conjugative Element) a été récemment proposé pour désigner ce nouveau type d'élément conjugatif qui diffère des transposons. (Burrus et al, 2002)

D'une façon similaire aux plasmides, il existe également des transposons mobilisables essentiellement décrits chez les bactéries Gram positif. (Churchward, 2002)

De nombreux éléments génétiques sont transférables par conjugaison, ils représentent les différents supports mobiles des gènes de résistance aux antibiotiques. Pour cette raison, la conjugaison bactérienne a une importance majeure dans la diffusion des gènes de résistance au sein du monde bactérien.

4. Supports génétiques des gènes de résistance :

La dissémination des gènes de résistance nécessite leur présence sur des supports génétiques pouvant être transmis à la descendance (transfert vertical) et capables de diffuser horizontalement d'une bactérie à une autre (figure 2). Les deux supports génétiques capables de se répliquer et donc transmis aux cellules-filles sont le chromosome et les plasmides. (Davison, 1999)

D'un point de vue général, les gènes de résistance sont toujours portés par l'une de ces deux structures génétiques dans la bactérie. Les deux molécules qui constituent le chromosome et les plasmides, sont le support des diverses structures génétiques comme les transposons, les intégrons, les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) qui véhiculent les gènes de résistance soit au niveau intra-cellulaire (transposons, cassettes des intégrons) ou inter-cellulaire (plasmides, transposons, ICEs conjugatifs ou mobilisables). (Towner, 1995)

2-1 Chromosome et plasmides

La résistance chromosomique aux antibiotiques peut être due soit à des mutations soit à la présence de gènes de résistance. La résistance par mutation présente une transmission verticale, elle apparaît à une fréquence de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-10} par génération.

La résistance chromosomique par mutation est essentiellement due à des modifications de la cible de l'antibiotique, ou à des dé-répressions de systèmes d'efflux intrinsèques habituellement réprimés.

Le chromosome peut également être le support de structures génétiques intégrées dans le chromosome comme certains plasmides, transposons, intégrons, ainsi que l'ensemble des éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs).

Les plasmides représentent la seconde structure d'ADN douée d'une répllication indépendante du chromosome. Les plasmides, découverts dans les années 1950-1960, sont des molécules d'ADN double brin, circulaire, cytoplasmique dont la taille varie de quelques kb à 500 kb.

Ils se répliquent de façon autonome, leur transmission d'une bactérie à une autre s'effectue habituellement par conjugaison, mais est également possible par transformation ou transduction. (Davison, 1999) ; Ils sont le support génétique de nombreuses propriétés permettant une meilleure adaptation des bactéries, comme la résistance aux antibiotiques, mais aussi la résistance aux

désinfectants, aux métaux lourds, ou aux toxines bactériennes. Certains plasmides portent également des facteurs de virulence, ou certaines fonctions métaboliques supplémentaires. Néanmoins les plasmides ne sont pas nécessaires à la survie de la bactérie dans des conditions physiologiques, ils deviennent utiles dans certaines conditions particulières d'environnement. Selon les plasmides, leur spectre d'hôte peut être plus ou moins large selon leur capacité de réplication dans les différentes espèces et genres bactériens.

A ce jour, un très grand nombre de plasmides ont été étudiés et notamment les plasmides R portant un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. (Ippen-Ihler et *al*, 1993) ; il s'agit pour la plupart de plasmides conjugatifs, qui peuvent être intégrés ou non au chromosome bactérien. Les plasmides constituent également les vecteurs inter-cellulaires des structures génétiques comme les transposons et les intégrons.

2-2 Transposons

Les transposons sont des éléments génétiques capables de se transférer entre le Chromosome et les plasmides mais aussi entre deux sites de la même molécule d'ADN (plasmide ou chromosome). La transposition correspond au mécanisme qui permet aux séquences d'insertion (IS) et aux transposons (Tn) de se déplacer dans le génome bactérien. Il existe deux classes principales de transposons : les transposons de classe I ou transposons composites et les transposons de classe II ou transposons non-composites. (Mahillon, 1998)

- **Transposons de classe I**

La séquence d'insertion (IS) représente l'élément transposable élémentaire, d'une taille comprise environ entre 1000 pb et 2000 pb, elle contient le matériel nécessaire à la transposition, c'est-à-dire un gène codant une transposase et des séquences inversées répétées à leurs extrémités. Ces séquences inversées répétées (IRL et IRR) sont impliquées dans la fixation de la transposase et dans les phases de coupure, d'excision, et de transposition de l'ADN. (Mahillon et *al*, 1998)

Les IS ont une séquence de reconnaissance sur l'ADN cible, la spécificité de ce site peut être plus ou moins étroite selon l'IS impliquée. La transposition a lieu après un clivage de l'extrémité 3' par la transposase. Il existe deux types de transposition, elle peut être conservative ou répllicative.

Lorsque le transfert s'effectue après coupure des 4 brins d'ADN de l'élément du donneur et insertion au niveau de la nouvelle cible, il s'agit d'une transposition conservative.

Si les coupures sont séquentielles et accompagnées d'une réplification simultanée de l'IS et de l'ADN cible, la transposition est alors répllicative avec formation d'un co-intégrant intermédiaire. (Chandler et *al*, 2002)

Les transposons composites, le plus souvent d'une taille inférieure à 10 kb, sont constitués de deux IS en orientation inversée ou directe à leurs extrémités qui encadrent différents gènes et notamment des gènes de résistance.

Le transposon Tn10 impliqué dans le transfert de résistance aux tétracyclines est constitué de deux IS10 et de plusieurs gènes dont les gènes *tetA* et *tetR* conférant la résistance aux tétracyclines. (Haniford, 2002)

Les transposons Tn9 (IS1) et Tn5 (IS50) sont également des transposons composites conférant respectivement la résistance au chloramphénicol et à la kanamycine, bléomycine, et streptomycine. Deux IS suffisamment proches sont en réalité capables de coopérer pour former un nouveau transposon composite. (Mahillon, 1998)

- **Transposons de classe II**

Les transposons de classe II également appelés transposons non-composites sont délimités par deux séquences inversées répétées (IRL et IRR) de 35 pb à 48 pb et ne possèdent pas d'IS. Leur taille est variable, certains transposons non-composites peuvent atteindre jusqu'à 70 kb comme Tn4651. Les représentants les plus connus sont Tn3 et Tn21, ils comportent un site de recombinaison spécifique (*res*) et deux gènes (*tnpA* et *tnpR*) impliqués dans la transposition codant une transposase et une résolvasse ainsi que des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds.

Classiquement la transposition des transposons non-composites s'effectue en deux étapes : la transposase reconnaît les IRL et IRR et induit un clivage permettant la jonction entre la molécule donneuse et receveuse. Après réplification du transposon, il se forme un co-intégrant intermédiaire qui est par la suite résolu par la résolvasse au niveau des deux sites *res* du cointégrant.

Il s'agit d'une transposition qui s'apparente en partie à la transposition répllicative des transposons composites.

Les transposons conjugatifs et mobilisables des bactéries Gram positif, leurs caractéristiques de transfert (excision, intégration) sont plus proches de celles des éléments conjugatifs et intégratifs.

Le transfert intra-cellulaire des transposons entre plasmides, entre le chromosome et les plasmides ainsi que le transfert intercellulaire des plasmides sont à l'origine d'une diffusion rapide des gènes de résistance dans de nombreuses bactéries d'espèces différentes. L'impact majeur des transposons

dans l'émergence de la résistance aux antibiotiques est due au fait qu'ils puissent s'intégrer au génome d'un grand nombre de bactéries et s'y maintenir. (Grindley, 2002)

2-3 Intégrons :

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes décrit pour la première fois en 1989. (Stokes et *al*, 1989)

Les intégrons sont constitués d'un système de recombinaison site-spécifique permettant l'insertion de gènes sous forme de cassettes de gène.

Ils permettent l'expression des cassettes de gène et agissent donc comme des vecteurs naturels de clonage et d'expression. De nombreuses cassettes de gène sont impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram-négatif.

Les intégrons de "Multi-Résistance de classe 1" sont à ce jour les mieux caractérisés et sont largement impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Trois "classes" d'intégrons dits de "Résistance" ou de "Multi-Résistance" (RI, Resistant Integron ou MRI, Multi-Resistance Integron) ont été définies sur la base des homologies de séquence protéique de leurs intégrases respectives (40 à 60 % d'identité en acides aminés)

De nombreux intégrons de "Résistance de classe 1" décrits durant ces dernières années, présentent une structure environnante plus complexe que celle décrite lors de la découverte des premiers intégrons. Ces avancées ont permis d'émettre de nombreuses hypothèses sur l'origine et la mobilité des intégrons.

Les systèmes de capture et d'expression de gènes que sont les intégrons joueraient un rôle important dans les processus de transferts horizontaux permettant ainsi l'évolution des génomes bactériens.

Les "Super-Intégrons" plus récemment décrits chez plusieurs espèces bactériennes pourraient représenter les ancêtres des intégrons de "Résistance".

Les intégrons de "Résistance" auraient évolué à partir des "Super-Intégrons" suite à l'acquisition des gènes *intI* et de leurs sites *attI* sur des structures mobiles comme les transposons. La capacité de mobilité des transposons, associée à celle d'acquérir et d'exprimer des gènes par les intégrons ainsi que la pression de sélection exercée par l'utilisation des antibiotiques auraient conduit à la sélection de cassettes de gènes de résistance parmi la variété de cassettes présentes dans les "Super-Intégrons". (Rowe-Magnus et *al*, 2001)

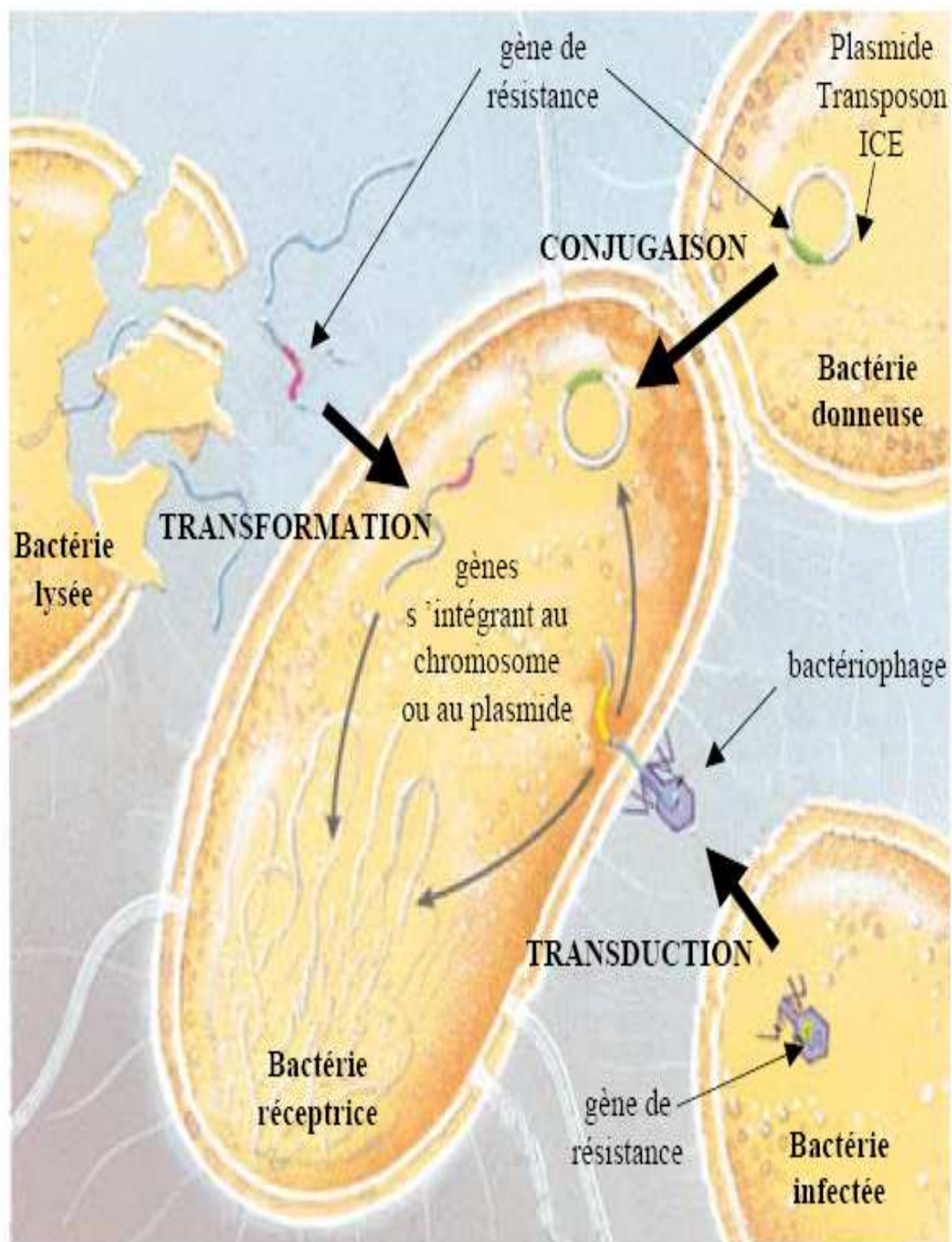


Fig 2 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert horizontal de gènes (Davison, 1999)

XII. Résistance aux antimicrobiens d'origine alimentaire

Le rôle de la chaîne alimentaire dans la transmission de bactéries résistantes est non seulement possible mais certains arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes comme *Salmonella*. De nombreux rapports notent effectivement la présence de bactéries productrices de CTX-M dans l'alimentation d'origine animale (Aarestrup et al, 2008).

En 2004, à la suite d'une épidémie à salmonelle survenue en France, une étude de cas identifia que les malades infectés par *Salmonella enterica* Newport résistant à la ceftriaxone avaient consommé de la viande de cheval importée hébergeant une souche de *S. enterica* Newport véhiculant le gène de résistance *bla*CMY-2 (Espie et al, 2004).

Lavilla et al. rapportèrent que les aliments d'origine animale pouvaient être un vecteur de la résistance à BLSE. En effet, parmi 10 foyers épidémiques de gastro-entérites d'origine alimentaire étudiés en Espagne, deux à plusieurs convives partageaient la même souche productrice de BLSE (Lavilla et al, 2009)

Une épidémie à *S. enterica* productrice de BLSE de type CMY-2 est également survenue aux Etats-Unis en 2002 (Zhao et al, 2003). La caractérisation des souches isolées à l'hôpital et chez des animaux d'élevage montre que certaines souches d'origine humaine et animale avaient des profils électrophorétiques identiques (Zhao et al, 2001).

En France, le réseau « *Salmonella* » a montré que sur les souches isolées entre 2002-2003, 8 souches de *S. enterica* Virchow d'origine aviaire et une d'origine humaine (prélèvement fécal) étaient toutes productrices du déterminant CTXM-9 ; La caractérisation moléculaire de ces souches a permis de montrer que toutes présentaient des profils de macrorestriction proches (94 % de similarité) laissant supposer que celles-ci étaient fortement liées. Ce gène *bla*CTX-M-9 est localisé sur un plasmide conjugatif transférable à *E. coli*. Les profils de restrictions *Eco*R1 obtenus après une digestion des plasmides de 6 des transconjugants étudiés présentaient de forte similarité aussi bien entre les transconjugants issus des isolats d'origine animale qu'humaine. (Weill et al, 2004)

CHAPITRE 2 : LES QUINOLONES

VIII. Définition :

Les quinolones sont des molécules organique artificielles possédant une activité antimicrobienne ; cette famille d'antibiotique a été découverte en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chlorquine destinée au traitement du paludisme, depuis 10000 dérivés ont été synthétisés. (Larouche, 2001)

IX. Structure chimique :

Les quinolones sont des dérivés de la quinoléine, il s'agit de molécules planes qui possèdent :

- Deux cycles aromatiques accolés, le premier est un cycle pyridine, le deuxième est un hétérocycle (pyridine ou pyrimidine) ou un benzène.
- Une fonction cétone en position 4.
- Une fonction carboxylique-COOH en position 3

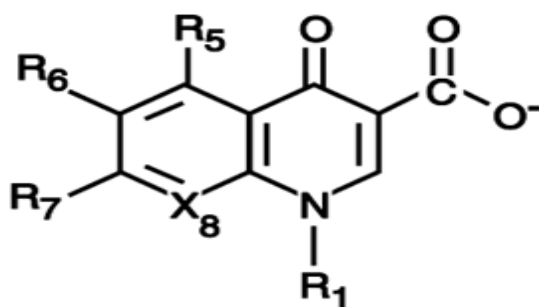


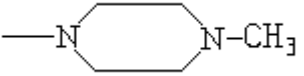


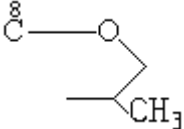



Fig 3 : Structure générale d'une quinolone (Ball, 2000)

X. Relation structure activité:

Les tableaux 1 et 2 présentent les relations entre la structure des quinolones et leur activité. L'élargissement du spectre d'activité est du principalement à la présence de l'atome de fluor en position 6 (Barry et *al.* 2001). Il permet une meilleure diffusion à travers la bicouche lipidique en établissant des liaisons avec les protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Cet atome de fluor augmente aussi l'affinité et / ou la sélectivité de la quinolone vis-à-vis de la DNA – gyrase bactérienne (Hooper et *al.*, 1993).

Tab 1 : Différentes structures des quinolones (Wepierre, 1981)

Molécule	R ₁	R ₆	R ₇	X
Acide nalidixique	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-N-
Acide pipémidique	-C ₂ H ₅	-H		-N-
Norfloxacine	-C ₂ H ₅	-F		-CH-
Pefloxacine	-C ₂ H ₅	-F		-CH-
Ciprofloxacine		-F		-CH-
Lévofloxacine		-F		-CH-

Tab 2 : Relation structure / activité des quinolones (Bryskier, 1995)

Position	Substituant du noyau Quinolone	Conséquences
1	Radical azoté	pK: biodisponibilité, diffusion tissulaire activité de base (inhibition DNA-gyrase)
3	Fonction carboxyle	Activité de base (stabilisation liaison à DNA-gyrase) Formation de sels de sodium solubles
4	Fonction cétone	Activité de base (chélation de Mg de DNA-gyrase) Diminution de biodisponibilité (formation de chélates)
6	Atome de fluor	Spectre: meilleure efficacité sur Gram – Spectre élargis aux Gram +
7	Chaîne aminé (cycle pypérazinique)	Meilleurs efficacité sur Gram + ; extension à Pseudomonas pK: Meilleure diffusion tissulaire.

XI. Classification et spectre antibactérien :

Les quinolones sont classées en plusieurs générations selon la chronologie de leur découverte et selon leur activité antibactérienne (tableau 3).

Les quinolones de 1ère génération dites classiques, sont actives uniquement sur des bactéries à Gram négatif : certains bacilles à Gram négatif comme les entérobactéries, *Haemophilus*, *Vibrio*, *Moraxella* et cocci à Gram négatif (méningocoque, gonocoque).

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre qui sont devenus très utilisés en médecine humaine et vétérinaire au fur et à mesure de l'émergence de résistance vis-à-vis des autres antibiotiques.

Les quinolones sont classées en quatre générations basées sur leur activité et leur

spectre d'action. En médecine vétérinaire, seules les 3 premières générations de quinolones sont utilisées, les fluoroquinolones de 4ème génération étant réservées à la médecine humaine.

Les quinolones de deuxième génération, qui sont des fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine, la norfloxacine ou l'ofloxacine en médecine humaine et la fluméquine en médecine vétérinaire ont une activité plus importante sur les bactéries à Gram négatif ainsi que contre certains pathogènes atypiques. Ces substances ont une bonne biodisponibilité orale. Leur principal inconvénient est leur efficacité limitée envers les bactéries à Gram positif.

Les fluoroquinolones de troisième génération, comme la gatifloxacine, la grepafloxacine, la levofloxacine, la moxifloxacine ou la sparfloxacine en médecine humaine et la danofloxacine, l'enrofloxacine, la difloxacine, l'orbifloxacine, l'ibafloxacine ou la marbofloxacine ont une activité étendue aux bactéries à Gram positif.

Les fluoroquinolones de quatrième génération, comme la gémifloxacine ou la trovafloxacine ont un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies. (Ball, 2000)

Les fluoroquinolones dans leurs ensembles ont aussi une activité sur les bactéries à développement intracellulaire comme les rickettsiales, les chlamydiales, les légionelles et les mycobactéries ou associées aux cellules comme les mycoplasmes. (Christiane, 2000)

Tab 3 : Classification des différentes générations des quinolones. (Dorosz, 2006)

<i>1ère génération</i>	<i>2ème génération</i>	<i>3ème génération</i>	<i>4ème génération</i>
<u>Acide Nalidixique</u>	<u>Ciprofloxacine</u>	<u>Sparfloxacine</u>	<u>Trovafloxacine</u>
<u>Acide Pipémidique</u>	<u>Levofloxacine</u>	<u>Grepafloxacine</u>	<u>Gémifloxacine</u>
<u>Acide Oxolinique</u>	<u>Ofloxacine</u>	<u>Gatifloxacine</u>	<u>Sitafloxacine</u>
<u>Fluméquine</u>	<u>Norfloxacine</u>	<u>Moxifloxacine</u>	<u>Clinafloxacine</u>
<u>Cinoxacine</u>	<u>Loméfloxacine</u>		
	<u>Péfloxacine</u>		
	<u>Enoxacine</u>		

XII. Association avec d'autres antibiotiques : (Christianne, 2000)

Un effet synergique est souvent noté pour les quinolones de première génération avec les aminosides, les polymixines et les sulfamides.

Des études ont montré que l'utilisation des fluoroquinolones en monothérapie aboutit à la sélection des germes mutants résistants ; l'association avec un autre antibiotique actif sur le germe impliqué réduit ce risque mais ne l'annule pas.

Entérobactéries : Association indifférente ou additive avec les aminosides et les β -lactamines.

Pseudomonas : Effet synergique avec β -lactamines ; les associations ciprofloxacine avec carboxy ou ureido pénicilline peuvent prévenir l'émergence de mutants résistants.

Staphylocoques : association possible et parfois synergique avec les aminosides, la vancomycine, la fosfomycine et l'oxacilline (souche MRSA+); antagoniste avec la rifampicine.

XIII. Pharmacologie :

4. Pharmacocinétique : (Claude et al, 1994 ; Dorosz, 2006)

1-1 Absorption et biodisponibilité

Les quinolones sont bien résorbés après administration orale, leur absorption digestive est rapide et importante ; 80% pour énoxacine, presque totale pour l'ofloxacine et la pefloxacine à l'exception de la norfloxacine (l'absorption est de 40% limitant ainsi son utilisation dans les infections urinaires).

1-2 Fixation aux protéines plasmatiques et distribution

Pour les quinolones de la première génération, la liaison aux protéines plasmatiques est forte, conduisant à des taux sériques faibles et une diffusion tissulaire faible, ne permettent pas d'utiliser ces produits pour le traitement des infections systémiques.

L'excellente diffusion dans le parenchyme rénal permet une utilisation dans les infections urinaires.

Pour l'ensemble des fluoroquinolones, ils présentent une excellente diffusion tissulaire, humorale et intracellulaire, y compris dans le LCR, la prostate, les os, la bile. De hautes

concentrations dans le tissu pulmonaire et les voies urinaires favorisent l'utilisation fréquente pour le traitement des infections urinaires et de certaines affections broncho-pulmonaires.

Certains agents pathogènes intracellulaires (mycobactéries, *Legionella*, *Coxiella burnetti*) peuvent également être touchés.

1-3 Demi -vie et excrétion

La demi vie est variable selon le produit, généralement courte pour les quinolones de 1^{ère} génération: 3 à 7 heures pour l'acide nalidixique ; 3 à 4 heures pour l'acide pipémidique ; 6 heures pour l'acide oxolinique ; 10 heures pour la fluméquine.

Elle varie de 3 à 5 heures pour la norfloxaciné et la ciprofloxacine ; et elle est longue avec la sparfloxacine, la fléroxaciné et la pefloxacine (3 à 10 ou 11 heures).

Les voies d'élimination diffèrent selon les quinolones, pour les quinolones de 1^{ère} génération, l'élimination biliaire et urinaire est très rapide, on note un passage placentaire et dans le lait maternel.

L'épuration rénale prédomine pour les fluoroquinolones et leurs métabolites, la pefloxacine et l'acide nalidixique sont éliminés préférentiellement par voie extrarénale.

L'élimination capillaire des fluoroquinolones peut permettre un suivi thérapeutique. En effet, l'élimination à ce niveau permet non seulement un suivi précoce mais permet de détecter la prise médicamenteuse durant de longs mois après la dernière prise (croissance des cheveux de 1 cm/mois).

Pour l'ofloxacine, il existe une relation linéaire entre la dose totale administrée par kilogramme de poids et la concentration (en mg/kg) de cheveu. L'ofloxacine possède une forte affinité pour la mélanine.

5. Pharmacodynamique :

Les quinolones sont des antibiotiques rapidement bactéricides (1 à 6 heures) à des concentrations égales à celles de l'activité bactériostatique (concentration minimale bactéricide CMB = concentration minimale inhibitrice CMI) ; cependant l'activité bactéricide augmente en fonction de la concentration, ce qui est appelé bactéricidie concentration –dépendante. (Firsov et *al*, 2003)

Les quinolones sont actives aussi bien sur les bactéries en phase de croissance, comme tous les antibiotiques, que sur les bactéries en phase stationnaire, comme de très rares antibiotiques (par exemple, la rifampicine), ce qui leur permet des indications thérapeutiques préférentielles dans les infections chroniques (infections osseuses et ORL) et les situations de portage bactérien (par exemple, *Salmonella*, méningocoque). (Christianne, 2000)

Les différentes études *in vitro*, *in vivo* et cliniques montrent indiscutablement une relation entre l'AUC (l'aire sous la courbe) / CMI et l'efficacité des fluoroquinolones ainsi que la prévention de l'émergence de bactéries résistantes, mais la détermination d'une valeur seuil semble difficile. De plus, une étude récente de Firsov *et al.* a montré que des valeurs usuelles, prédictives d'une bonne efficacité sur les souches sensibles peuvent accroître le risque de mutants résistants (Firsov *et al.*, 2003)

6. Indications thérapeutiques :

Les fluoroquinolones sont utilisées pour traiter de nombreuses infections, incluant les infections urinaires, les prostatites, les maladies sexuellement transmissibles, les infections du tractus digestif et du tractus respiratoire, les infections ostéo-articulaires et les infections cutanées et des tissus mous. (Davis *et al.*, 1996)

Un autre domaine d'indication vise la microflore digestive. Il s'agit des traitements des entérites bactériennes, des décontaminations sélectives, ou des prophylaxies des diarrhées du voyageur. Les fluoroquinolones sont notamment utilisées en prophylaxie chez les patients suivant une chimiothérapie, afin de diminuer le risque d'infections opportunistes par les bactéries commensales du tube digestif. Elles sont également utilisées en prophylaxie chez les patients immunodéprimés pour décontaminer le tube digestif, avant une chirurgie ou pour prévenir la survenue d'une péritonite chez les patients cirrhotiques (Grange *et al.*, 1998)

XIV. Mécanisme d'action des quinolones :

1. Cibles cellulaires : (Craig *et al.*, 1998 ; Goa *et al.*, 1997 ; Hooper, 1995)

Les quinolones ont pour cible les topo-isomérases, enzymes servant à enrouler et dérouler, nouer et dénouer le chromosome bactérien lors de la réplication et la transcription.

Les topoisomérases modifient le super-enroulement de l'ADN en le coupant puis en le recollant. On les classe dans trois grands groupes:

- Les topoisomérases de type I ne coupent qu'un seul des deux brins de la double hélice d'ADN et permettent la relaxation de super-enroulements négatifs.
- Par contre les topoisomérases de type II (gyrase) et topo-isomérase IV coupent les deux brins de la double hélice.
- Des topoisomérases particulières sont impliquées dans la transposition et l'excision de phages de l'ADN.

Ces enzymes sont vitales pour la bactérie, et leur inhibition entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription, donc de la synthèse des acides nucléiques (bactériostase), puis la mort de la bactérie (bactéricidie). Les topo-isomérases bactériennes, cibles des quinolones, sont l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Les quinolones ont une activité 10000 fois plus faible sur les topo-isomérases des cellules eucaryotes.

➤ **La DNA –gyrase :**

C'est un tétramère composé de 2 sous-unités A et 2 sous-unités B codées respectivement par les gènes *gyr A* et *gyr B*.

Son rôle est de maintenir un certain degré d'enroulement négatif de l'ADN ; elle facilite le déplacement des complexes de réplication et de transcription en ajoutant un surenroulement négatif en amont des complexes.

Elle élimine les nœuds apparaissant dans l'ADN et aide à la formation des boucles et de replis de l'ADN.

➤ **La topo-isomérase IV :**

Cette enzyme présente des sous unités homologues à celle de la DNA gyrase : les gènes *par C* et *parE* codent respectivement pour les sous-unités C et E.

Elle est aussi capable de relâcher des ADN surenroulés, mais cette activité est 5 fois plus faible que son activité de décaténation, elle intervient aussi dans la partition des chromosomes lors de la croissance bactérienne. (Hoshino *et al*, 1994)

L'inhibition de la topo-isomérase IV se caractérise par un arrêt lent de la réplication et a un effet d'abord bactériostatique. (Khodursky *et al*, 1995).

2. Mode d'action :

Les complexes formés entre l'ADN et la DNA gyrase sont piégés par les quinolones dans une réaction réversible qui bloque la synthèse d'ADN et la croissance (figure 3); La mort cellulaire intervient de deux manières possibles:

- La première implique la séparation de complexes gyrase-quinolones avec l'ADN, entraînant la formation de morceaux d'ADN double brin létaux, cette séparation existe pour toutes les quinolones et est bloquée par les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de protéine.
- Le deuxième mécanisme mortel est attribuée à la dissociation des sous unités de la gyrase alors que l'enzyme est incluse dans un complexe ADN-gyrase, cette dissociation entrainerait la formation de terminaison d'ADN double brin (DNA ends), ce deuxième mécanisme aurait lieu lorsque les cellules sont traitées avec une forte concentration en fluoroquinolones, l'effet létal est alors insensible aux inhibiteurs de la synthèse de l'ARN et des protéines.

Ces deux mécanismes létaux existe aussi avec la topoisomérase IV, leurs mise en évidence chez *Escherichia coli* est très difficile car la topoisomérase IV n'est que la cible secondaire des quinolones pour cette bactérie (Drilica et al, 1997)

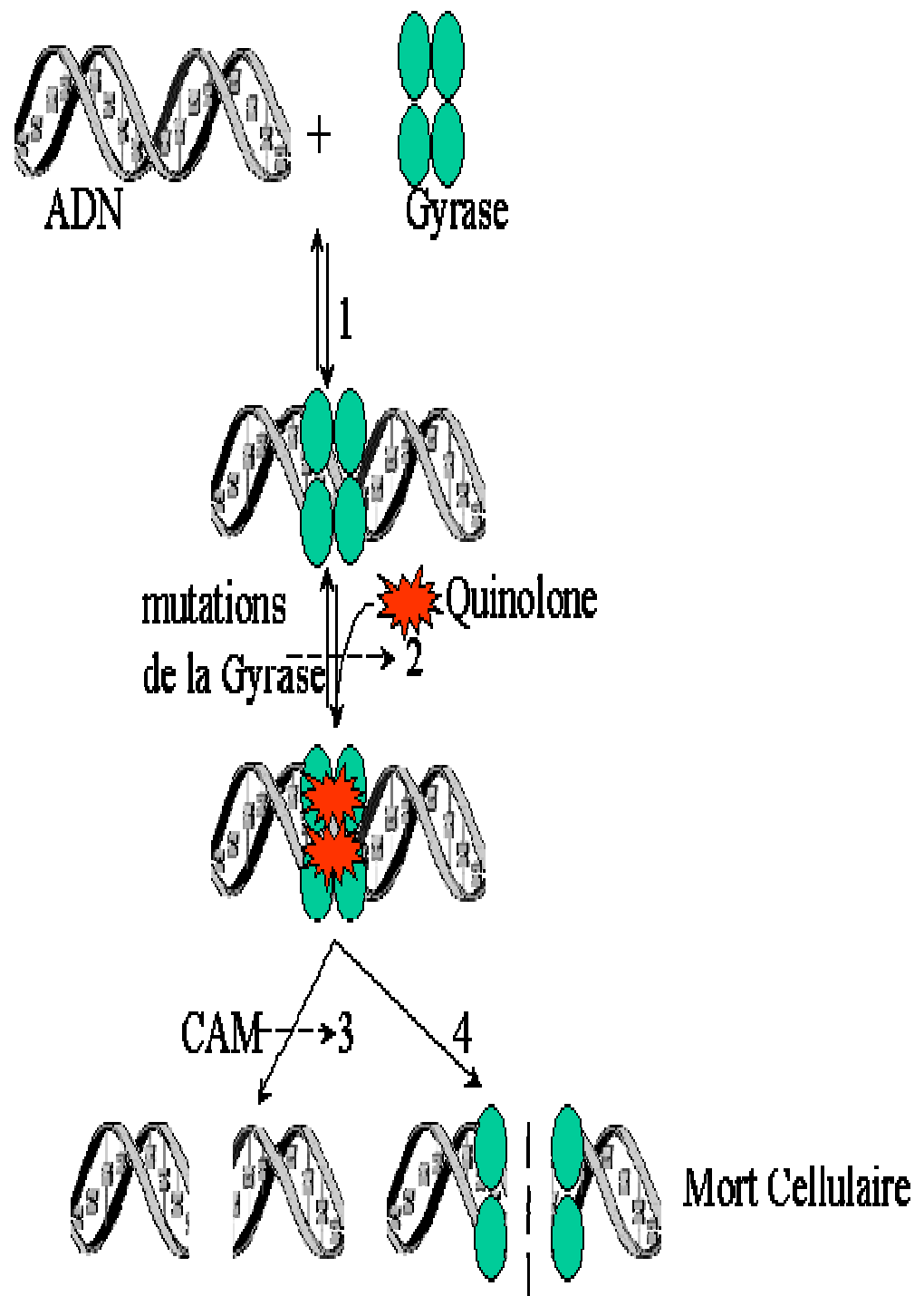


Fig 3 : Mode d'action des quinolones contre la DNA gyrase et la topoisomérase IV (Drilica et al, 1997)

VIII. Mécanisme de résistance aux quinolones :

4. Résistance intrinsèque (Everett et al, 1998 ; Le Minor et al, 1982)

Certains micro-organismes sont résistants aux quinolones disponible de façon intrinsèque aux concentrations thérapeutiques, notamment certaines espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires comme *Burkholderia mallei*, *B.pseudomallei*, les champignons et les levures.

Le mécanisme de résistance pour ces micro-organismes n'a pas été déterminé avec précision, il s'agit probablement de l'association d'une imperméabilité membranaire et d'une faible affinité pour les cibles intracellulaire, telles l'ADN-gyrase ou la topoisomérase IV.

5. Résistance acquise par mutation :

La résistance acquise aux quinolones est principalement à caractère chromosomique par sélection de mutants préexistants ; les enzymes cibles, suite à une mutation, deviennent moins sensibles, voire totalement insensible à l'action inhibitrice des quinolones.

2-1 Modification de la DNA-gyrase :

Ces mutations affectent principalement le gène *gyrA*, puis le gène *gyrB* codant pour les sous-unités A et B de la DNA-gyrase.

L'analyse séquentielle de l'ADN bactérien montre que les mutations entraînant une résistance concernent fréquemment les acides aminés proches du site de fixation de la sous-unité GyrA (Tyr122 chez *Escherichia coli*) ; cette région est nommée QRDR, c'est la région déterminante pour la résistance aux quinolones (Yoshida et al, 1988 ; Yoshida et al, 1990) elle s'étend des acides aminés 67 à 106.

Toutefois il existe des mutations situées en dehors de la QRDR qui peuvent aussi être responsable de résistances (Friedman et al, 2001).

Les mutations de *gyrB* conférant un haut niveau un haut niveau de résistance sont aussi situés dans une région spécifique : Asp246 et Lys447 du gène *gyrB* chez *Escherichia coli* (Yamagishi et al, 1986)

2-2 Modification de la topoisomérase IV :

Les mutations peuvent aussi concerner les gènes *parC* et *parE* codant pour les deux sous-unités de la topoisomérase IV (Khodursky et al, 1995).

Chez *Escherichia coli*, la DNA-gyrase est la cible principale (Hooper, 2001), si bien que les bactéries résistantes par mutation du gène *parC* ne sont détectable que chez les mutants *gyrA* et à des concentrations élevées en fluoroquinolones (Khodursky et al, 1995 ; Chen et al, 1996)

Ainsi une mutation entraînant une résistance sur l'une des sous-unités de la topoisomérase IV (cible secondaire) fait apparaître peu ou pas de phénotypes de résistance tant que la DNA-gyrase (cible principale) n'a pas subi de mutation (Khodursky et al, 1995)

2-3 La diminution de l'accumulation intra-bactérienne :

➤ La modification de la perméabilité membranaire :

Les souches mutantes résistantes aux quinolones se caractérisent par une perte totale ou partielle de la porine OmpF ; le passage par cette dernière est partagé avec les tetracyclines, l'imipinèmes, certaines céphalosporines et le chloramphénicol, ainsi la perte de la protéine Omp F résulte une résistance à toutes ces molécules.

➤ La diminution de la concentration cellulaire par efflux actif :

Ce mécanisme est un moyen pour les bactéries à Gram négatif de maintenir une concentration sub-inhibitrice en antibiotique dans la cellule.

Les systèmes de pompes d'efflux impliquées dans le rejet d'antibiotiques sont généralement classées en trois familles selon les homologies de séquences d'acides aminées, on distingue "la major facilitator superfamily" (MFS), la resistance nodulation division family (RND) et "la multidrug and toxic compound extrusion family (MATE) (tableau 4) (figure 4).

L'énergie nécessaire au fonctionnement de ces pompes est fournie par le gradient de concentration protonique entre l'extérieur et l'intérieur de la bactérie.

Ces pompes d'efflux présentent une très faible spécificité, elles sont donc aussi nommées "transporteur multidrogues". (Pool et al, 2000)

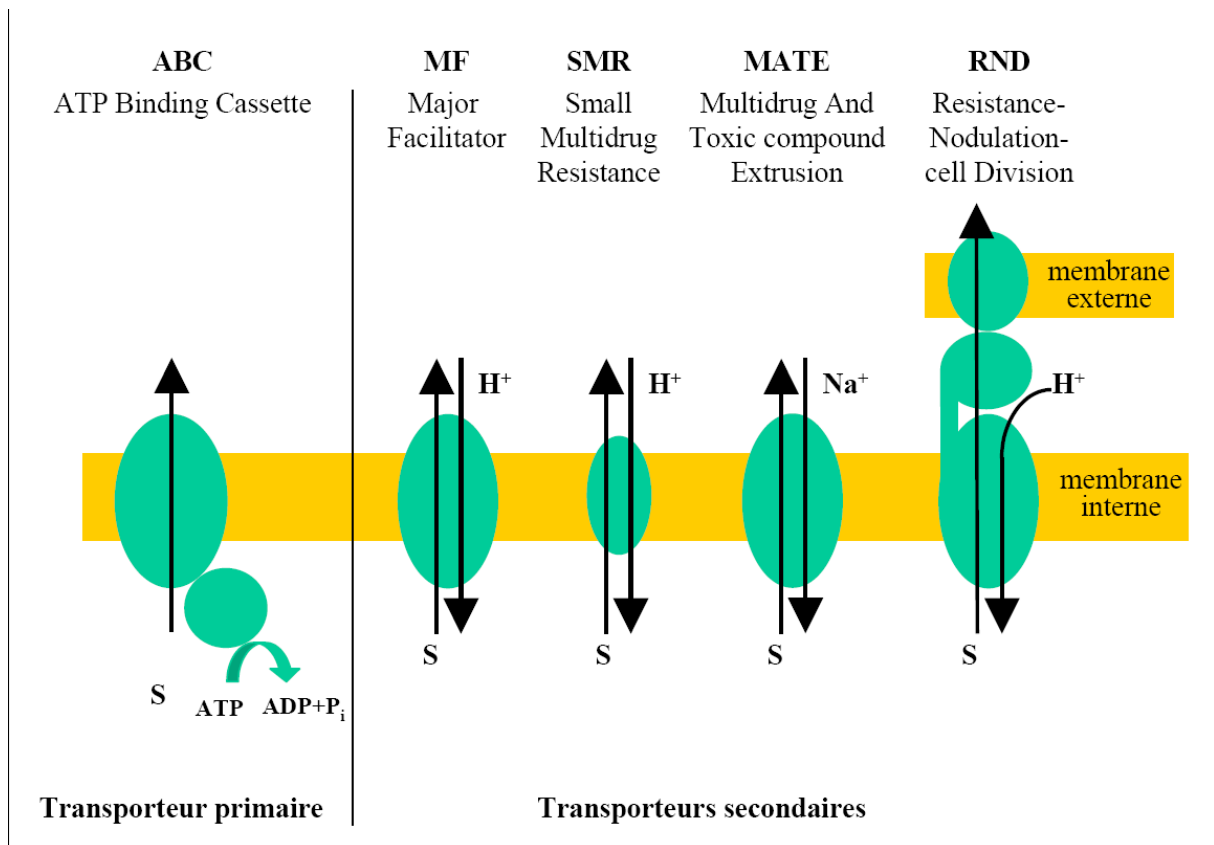


Fig 4 : Structure schématique des cinq superfamilles de pompes d'efflux à antibiotiques. (Pool et al, 2000)

Tab 4 : Système d'efflux multidrogues d'*E. coli* (Nicaidou, 1996)

Système d'efflux	Protéine de transport	Protéine periplasmique	Canal de la membrane externe	Substrat
Type RND AcrAB	Acr	AcrA	Tolc	Fluoroquinolones Tetracyclines Chloramphenicol Erythromycine
Type MF EmrAB	EmrB	EmrA	Tolc	Acide nalidixique

6. La résistance plasmidique :

La résistance plasmidique a été décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* hébergeant un plasmide codant pour une protéine QnrA, protégeant l'ADN gyrase de la fixation des quinolones (Martínez-Martínez *et al*, 1998). Deux autres mécanismes de résistance plasmidique ont été rapportés récemment : inactivation des quinolones par l'acétyltransférase AAC (6')-Ib-cr (Robicsek *et al*, 2006) et dernièrement, excréation active des FQ via la pompe d'efflux QepA (Périchon *et al*, 2007)

3-1 Les déterminants de résistance de type Qnr

La résistance plasmidique aux quinolones a été découverte lors de l'exploration de la résistance aux β -lactamines chez une souche de *K. pneumoniae*.

Il a été ensuite démontré que le plasmide pMG252 hébergeait le gène *qnr* codant pour une protéine, QNR, de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. QNR entre en compétition avec les quinolones pour la fixation à l'ADN gyrase. (Tran *et al*, 2002).

A ce jour trois Qnr ont été mises en évidence, Qnr A, Qnr B et Qnr S. Six allèles d'un qnr A, 19 allèles qnrB et 4 allèles qnr S sont rapportés pour le moment.

Chacun des trois possède 40 à 60 % d'homologie de séquence nucléotidique entre eux.

Les allèles d'un *qnr* différent de moins de 8 %, QnrB est le groupe avec le plus de diversité décrite (Jacoby *et al*, 2008)

La résistance plasmidique aux quinolones est de bas niveau, avec des CMI de la ciprofloxacine de 0.1 mg/L) difficilement détectable par l'antibiogramme.

Le gène *qnrA* donne une résistance à l'acide nalidixique mais pas aux fluoroquinolones; mais la détermination des CMI des fluoroquinolones, pour des transconjugants *qnrA* indique des valeurs de 0.25 à 16 mg/L; ces valeurs correspondent à une résistance 20 fois supérieure à celles observées pour les souches non conjuguées.

Bien qu'occasionnant une résistance de bas niveau, il apparaît que la présence de ce gène facilite la sélection de mutants chromosomiques des topoisomérase de type II. (Rodriguez-Martinez *et al*, 2007)

Les déterminants de résistance de type Qnr sont de dissémination mondiale (tableau 5) L'origine des gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques reste dans la très grande majorité des cas totalement inconnue; c'est la raison pour laquelle une recherche du pro géniteur de *QnrA* avait été entreprise parmi 48 espèces de bacilles à Gram négatif.

Des gènes de type *qnr A* ont été retrouvés sur le chromosome de toutes les souches testées de *Shewanella algae*, (désignant cette espèce aquatique, qui est occasionnellement pathogène pour l'homme comme le réservoir du déterminant de résistance *QnrA*

L'utilisation des quinolones en thérapeutique vétérinaire dans les fermes d'élevage de poissons a pu favoriser le transfert du gène chromosomique vers un plasmide et la sélection des souches transconjugantes. (Camille, 2007)

Tab 5: Caractéristiques épidémiologiques des variants de type Qnr
(Nordmann et al, 2005 modifié)

	Déterminants plasmidiques de type Qnr		Localisation
	Variants	Espèces	
QnrA	QnrA1	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.	Mondiale
	QnrA2	<i>K. oxytoca</i>	Chine
	QnrA3	<i>Salmonella enteritidis</i>	Hong Kong
	QnrA5	<i>P. mirabilis</i>	France
	QnrA6	<i>P. mirabilis</i>	Tunisia (Mahrouki et al, 2011)
QnrB	QnrB1	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i>	Inde, Nigeria Algerie (Labadene et al, 2008)
	QnrB2	<i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella mbandaka</i> , <i>Salmonella keurmassar</i>	États-Unis, Sénégal, Taiwan
	QnrB3	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i>	États-Unis
	QnrB4	<i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	États-Unis Algerie
	QnrB5	<i>Salmonella berta</i>	États-Unis
	QnrB6	<i>C. freundii</i>	Argentine
QnrS	QnrS1	<i>S. flexneri</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i>	Japon, Royaume Unis, Taiwan, États-Unis, France, Vietnam, Algerie (Touati et al, 2008)
	QnrS2	<i>Salmonella anatum</i>	États-Unis , Allemagne

3-2 Inactivation des fluoroquinolones par l'acétyltransférase: AAC (6')-Ib-cr

Un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches *d'Escherichia coli* isolées en Chine en 2006. Il s'agit d'une inactivation des FQ par acétylation au niveau de l'azote aminé du substituant pipérazinyl.

Le déterminant de cette résistance est un variant d'une aminoside *N*-acétyltransférase AAC-(6')-Ib-cr dont le gène codant présente deux mutations spécifiques au niveau des codons 103 et 179 entraînant l'inactivation des FQ.(Park *et al*, 2006)

L'épidémiologie de ce gène n'est pas encore bien étudiée. Il semble qu'il soit bien répandu en Chine et en Amérique du Nord. Le variant *aac(6')-Ib-cr* a été mis en évidence chez 50% des 78 *E. coli* résistantes aux FQ isolées à Shanghai et ce indépendamment de la présence du gène *qnrA* auquel il était associé dans la souche explorée. Une étude de Park *et al*, 2006 a montré que 50% des 313 entérobactéries étudiées ayant une CMI de la ciprofloxacine > 0.25 µg/ml hébergeaient le gène *aac(6')-Ib* dont 28% portent le variant *aac(6')-Ib-cr*. AAC-(6')-Ib-cr est la première enzyme décrite qui inactive deux antibiotiques de familles différentes.

L'acquisition de la résistance à un antibiotique correspond à un gain de fonction qui a un coût biologique, ici ce coût est un plus bas niveau de résistance aux aminosides. (Robicsek *et al*, 2006)

3-3 Qep A : pompe d'efflux putative plasmidique FMS :

un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux fluoroquinolones a été découvert chez une souche *d'E. coli* isolée en Belgique. (Perichon *et al*, 2007)

Le gène *qepA* code pour un homologue d'un transporteur à 14- segments transmembranaires dépendant des protons. Son implication dans la résistance aux FQ (augmentation de 10 fois la CMI de la ciprofloxacine chez le transconjugant) a été confirmée par la mesure de l'accumulation de la norfloxacine sans et avec CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), inhibiteur des pompes proton motrices. Les FQ étant des antibiotiques synthétiques, le substrat préférentiel de QepA n'a pas été identifié

Le gène *qepA* a été rapporté chez une souche *d'E.coli* au Japon suggérant sa dissémination mondiale (Yamane *et al*, 2007).

X. Résistance aux fluoroquinolones en médecine vétérinaire :

Les fluoroquinolones constituent un important groupe d'antibiotiques - faisant partie des quinolones - qui sont destinés à lutter contre la maladie chez l'homme et l'animal. Il est cependant possible que leur utilisation pour le bétail contribue à accroître la résistance de bactéries présentes dans les aliments (comme *Campylobacter* et *Salmonella*) qui peuvent infecter l'homme. Les fluoroquinolones sont importants pour la lutte contre les infections invasives à *Salmonelles* et à *Campylobacter* et un accroissement de la résistance de ces bactéries est donc un sujet de préoccupation. (OMS, 1998)

Il existe peu d'études sur l'effet direct de l'utilisation des fluoroquinolones sur la flore commensale chez l'animal. Chez le porc, il a été montré qu'un traitement à l'enrofloxacin par voie orale ou intramusculaire aux doses usuelles entraînait un développement rapide de la population coliforme résistante aux fluoroquinolones quelle que soit la voie d'administration et que cette résistance persistait durant au moins deux semaines après l'arrêt du traitement (Wiuiff *et al*, 2003). Cette étude a été confirmée lors de traitement de truies par la fluméquine. Ce traitement a entraîné une augmentation de la sous-population d'*E.coli* résistante aux fluoroquinolones chez les truies ainsi que dans leur descendance, mais dans une moindre mesure. Cette émergence d'*E.coli* résistantes aux fluoroquinolones n'a été que transitoire et la flore sensible aux fluoroquinolones a été restaurée dans les 2 mois qui ont suivi l'arrêt du traitement (Belloc, 2005).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Pultz *et al*. 2008 qui observent chez des souris traités aux fluoroquinolones la suppression des bactéries à Gram négatif de la flore intestinale mais pas d'émergence de résistance au sein de cette population.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1: MATERIELS ET METHODES :

III. Prévalence de la résistance aux quinolones dans la ville d'Annaba :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de l'université Badji Mokhtar de Annaba; en collaboration avec le laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalier Unniversitaire - Annaba.

Sur une période allant du 1^{er} janvier 2004 à la fin décembre 2008, et 15993 prélèvements divers ont été reçus des services hospitaliers pour une analyse bactériologique devant une suspicion d'infection.

Parmi les 7425 souches collectés présumé responsables d'infection, seules 4747 souches ont été testés aux quinolones. (L'acide nalidixique pour les entérobactéries et la péfloxacine pour les bactéries à Gram négatif non entérobactéries) ; Ainsi on a retenue 1579 souches présentant une résistance à au moins une molécule de la famille des quinolones qu'on appellera « souches QR ».

L'identification des souches retenues a été réalisée par galerie biochimique classique et leur sensibilité aux antibiotiques a été testée sur milieu de Mueller- Hinton par la méthode de diffusion en milieu solide et l'interprétation des résultats est faite en adoptant les diamètres de référence établie dans le communiqué de la Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS (2003).

- **Technique d'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide :**

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée sur milieu de Mueller- Hinton par la méthode de diffusion en milieu solide décrite dans le communiqué de la Standardisation de

l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS (2003)

Milieu :

- Gélose Mueller Hinton (MH), coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (une densité optique égale à 0.2 à 650 nm).
- L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Application des disques d'antibiotiques :

- Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

Incubation : 18 heures à 37°C

Lecture : Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée puis comparer ces résultats aux valeurs critiques.

Les disques d'antibiotiques (bioMérieux) suivants ont été testés : amoxicilline (25 ug), amoxicilline-acide clavulanique (20/10 ug), imipénème (10 ug) céfoxitine (30 ug), céfépime (30 ug), céftazidime (30 ug) , céfotaxime (30 ug) , aztreonam (30 ug) , gentamicine (10 ug) , amikacine (30 ug), tobramycine (10 ug) , kanamicine (30 ug), acide nalidixique (30 ug), ciprofloxacine (5ug),), tétracycline(30ug) et trimetoprim sulfaméthoxazole (1.25/23.75).

La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 (souche sensible à tous les antibiotiques) a été utilisée comme souches de contrôle (délivré par l'institut Pasteur de Paris).

IV. Caractérisation moléculaire du support génétique de la résistance

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'institut Pasteur de Casablanca – Maroc en collaboration avec l'institut Pasteur de Paris.

1. Souches bactériennes :

Les souches d'entérobactéries sélectionnées pour cette étude sont 25 souches cliniques résistantes à l'Acide Nalidixique (tableau 6) collectées au laboratoire de Microbiologie du centre hospitalier de la ville d'Annaba et dont l'identification a été réalisée par les galeries Api system 20 E (galerie pour entérobactéries).

2. Sensibilité aux antibiotiques :

- **Antibiogramme :**

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton et interprété après mesure des diamètres d'inhibition en accord avec les recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CA-SFM.

- **Recherche des β -lactamases à spectre étendue :**

La recherche de BLSE a été réalisée par la méthode classique basée sur la détection de la synergie entre un disque d'Amoxicilline –Acide clavulanique et trois disques de Céphalosporine de troisième génération : Cefotaxime, Ceftazidime et Aztreonam.

Tab 6: Origine des souches d'entérobactéries étudiées

code	Souches	Origine	Date d'isolement	Services
1	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	Urine	Mars 2006	Endocrinologie
2	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	Liquide bronchiale	Juin 2007	ND
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pus	Mars 2006	Endocrinologie
4	<i>Proteus mirabilis</i>	Pus	Janvier 2006	Endocrinologie
5	<i>Proteus mirabilis</i>	Pus	Mars 2007	Chirurgie
6	<i>Proteus mirabilis</i>	Urine	Juin 2007	Urologie
7	<i>Proteus mirabilis</i>	Liquide d'ascite	Mai 2007	Chirurgie
8	<i>Proteus mirabilis</i>	Urine	Mars 2007	Endocrinologie
9	<i>Escherichia coli</i>	Urine	Avril 2006	Externe
10	<i>Morganella morgani</i>	Pus	Novembre2006	Endocrinologie
11	<i>Proteus vulgaris</i>	Pus	Février 2006	Endocrinologie
12	<i>Proteus vulgaris</i>	Urine	Juin 2006	Chirurgie
13	<i>Proteus mirabilis</i>	Pus	Juin 2006	Endocrinologie
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Juin 2008	Endocrinologie
15	<i>Morganella morgani</i>	Urine	Février 2007	Endocrinologie
16	<i>Proteus vulgaris</i>	Pus	Mars 2007	Externe
17	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	Pus	Juillet 2008	Externe
18	<i>Escherichia coli</i>	sang	Juillet 2008	Chirurgie
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Mars 2008	Endocrinologie
20	<i>Escherichia coli</i>	urine	Mai 2008	Endocrinologie
21	<i>Escherichia coli</i>	urine	Juin 2008	Urologie
22	<i>Escherichia coli</i>	urine	Juin 2008	Externe
23	<i>Proteus mirabilis</i>	urine	Avril 2008	Externe
24	<i>Escherichia coli</i>	Pus	Mai 2008	Externe
25	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Mai 2008	Externe
26	<i>Escherichia coli</i>	Urine	Juin 2008	Externe

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI):**

La CMI d'un antibiotique est la plus faible concentration antibiotique inhibant toute croissance visible d'un germe donné ; elle est considérée comme la valeur de référence pour définir la susceptibilité d'un microorganisme à un antibiotique.

Pour les souches *qnr* positives, la détermination des CMI a été réalisée par la technique du E-test.

Les E-Tests sont des bandelettes en plastique non poreuses le long desquelles 15 valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour un antibiotique donné y sont calibrées.

Un gradient prédéfini d'antibiotique est fixé sur la face de la bandelette opposée à l'échelle imprimée des CMI. Cette face sera celle mise en contact direct avec le milieu agarisé,ensemencé avec la souche à tester. L'antibiotique en contact avec l'agar diffusera en recréant le gradient prédéfini dans le milieu de culture. La bactérie ensemencée poussera en formant une zone d'inhibition de croissance elliptique.

La valeur lisible à la zone d'intersection entre la bandelette et l'ellipse de croissance bactérienne correspondra à la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique donné, exprimée en µg/ml. (CLSI, 2005)

3. Extraction de l'ADN Total

La technique décrite par (Honoré et *al*, 2006) est une technique rapide utilisée pour l'extraction de l'ADN total des entérobactéries. L'ADN total a été extrait par choc thermique:

Technique :

- Pour chaque souche, ensemencer le milieu Trypticase soya agar (TSA), puis incubé à 37°C pendant 18 heures.
- Dissociées Deux à trois colonies dans 500 µl d'eau pour biologie moléculaire
- Faire chauffer à 95°C cette suspension, pendant dix minutes, puis refroidie immédiatement dans de la glace.
- Centrifuger pendant deux minutes à 13 000 tours par minute,
- le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

4. Dépistage du Gène *qnr* par La PCR Multiplex :

La « Polymerase Chain Reaction » ou PCR est une technique qui permet l'amplification de segments d'ADN situés entre les sites d'appariement de deux amorces. Cette technique implique une série de cycles de dénaturation de l'ADN, appariement ("annealing") d'oligonucléotides sur des sites précis d'ADN simple brin, et synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à l'aide d'une polymérase thermorésistante, la *Taq* polymérase: *Thermus aquaticus* polymérase. (Kaneko, 1985).

Le dépistage des gènes *qnr* a été réalisé par PCR Multiplex sur toutes les souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique en utilisant les amorces spécifiques (tableau 7).

Pour valider la réaction de PCR diverses souches de référence (délivré par l'institut Pasteur de Paris) sont utilisées comme témoin positif.

E. coli U2A2118 (*qnr A1*)

E. coli U2A2120 (*qnr S1*)

E. coli U2A2119 (*qnr B1*)

- **Préparation de la réaction :**

La réaction de PCR se fait sous un volume final de 100 μ l, dans un tube Eppendorf, on prépare le mélange ci-dessous en multipliant chaque volume par le nombre d'échantillon d'ADN étudiés, et prévoir un tube sans ADN qui servira de témoin négatif; Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte de biologie moléculaire et comprend :

- **Solution de mélange :**

Tampon de la réaction 10x	—————>	10 μ l
MgCl ₂ 50 mM	—————>	5 μ l
dNTP 5 mM	—————>	2 μ l
Oligo A (+)	—————>	1 μ l
A (-)	—————>	1 μ l
Oligo B (+)	—————>	2 μ l
B (-)	—————>	2 μ l
Oligo S (+)	—————>	1 μ l
S (-)	—————>	1 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase	—————>	0.6 μ l
ADN	—————>	1 μ l
H ₂ O	—————>	qsp 100 μ l

La réaction se fait dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Warrington, UK) en réalisant 30 cycles de 94°C pendant 5 min, 94°C pendant 1min, 60°C pendant 45 secondes et 72°C pendant une minute. (Guessennd et *al*, 2008)

5. Dépistage du Gène *aac (6')-Ib* par PCR :

La recherche du gène *aac (6')-Ib* a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques (tableau 7) ; La PCR est réalisée sur toutes les souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique. La souche de référence utilisée et qui sert de contrôle positif est : *E.coli* U2A1528

- **Préparation de la réaction :**

La réaction de PCR se fait sous un volume final de 50 µl. Dans un tube Eppendorf, on prépare le mélange ci-dessous en multipliant chaque volume par le nombre d'échantillon d'ADN étudiés, et prévoir un tube sans ADN qui servira de témoin négatif; Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte de biologie moléculaire et comprend :

- **Solution de mélange**

Tampon de la réaction 10x	—————→	5 µl
MgCl ₂ 50 mM	—————→	2.5 µl
dNTP 5 mM	—————→	2 µl
Oligo (+)	—————→	1 µl
(-)	—————→	1 µl
<i>Taq</i> DNA polymerase	—————→	0.2 µl
ADN	—————→	1 µl
H2O biologique stérile	—————→	qsp 50 µl

La réaction est réalisée suivant les conditions d'amplification suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min, puis une élongation finale de 72°C pendant 7 min (Park et *al* , 2006).

6. Dépistage des gènes de β - Lactamase et de *ampC* par PCR :

La recherche des gènes de β - Lactamase : *bla* gène (TEM, SHV, CTX M, CMY, VEB) et de *ampC* (*dha*) a été réalisée par PCR sur l'ADN total des souches productrice de BLSE. Toutes les conditions de PCR et les primers utilisés sont résumés dans les tableaux 7 et 8. Pour valider la réaction de PCR diverses souches de référence sont utilisées (délivré par l'institut Pasteur de Paris).

Salmonella sp U2A1446 (*TEM1*+ *SHV12*)

E. coli U2A1790 (CTXM groupe 1)

E. coli U2A1799 (CTX M groupe 2)

E. coli U2A1796 (CTX M9 + CMY2)

K. pneumoniae U2A2240 (dha)

7. Analyse des produits de PCR :

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'ethidium (BET) à la concentration finale de 0,5 µg/ml, et tamponné avec du TBE x 0.5 (Tris Borate Ethylène Diamine Tétracétique Acide).

10 µl d'ADN amplifié est déposé dans chaque puit avec un alourdisseur : le bleu de dépôt; Un marqueur de poids moléculaire λ de 100 pb (coupé par *Hind III*) est utilisé pour repérer la taille des bandes obtenues. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 100 V pendant une heure. La lecture s'effectue sous une lampe à U.V. (Ultra Violet) avec un imageur, intégrant le logiciel informatique Alpha Imager (Alpha Inntech Corporation, San Leandro, USA). (Tagu et al, 2003)

Aucun produit d'amplification ne doit apparaître pour le témoin négatif (tube sans ADN). Les produits d'amplification obtenus pour les souches de contrôle doivent avoir la taille attendue. Lorsqu'il ya un produit d'amplification avec l'ADN de la souche étudiées, comparer la taille du fragment obtenu avec celle de la souche de contrôle.

8. Purification des produits PCR: (Bogard, 1998)

Ce protocole permet de purifier les produits PCR pour effectuer ensuite la réaction de séquençage; Les échantillons amplifiés sont purifiés selon le protocole de purification enzymatique, ainsi deux types d'enzymes sont utilisés:

1- **L'exonucléase I** : permet d'éliminer les amorces libres grâce à son activité exonucléasique

2- **La Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (ou phosphatase de crevette)**: Enlève les phosphates en 5' des dNTP et donc rend leur incorporation dans l'ADN impossible.

Cette purification enzymatique nécessite deux incubations successives :

Incubation à 37°C : permet l'action des enzymes

Incubation à 85 °C : permet la dénaturation des enzymes.

Le produit PCR est ensuite directement utilisable pour la réaction de séquençage.

- **Préparation du mix de purification :**

(0.2 à 0.4) µl	→	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)
(0.2 à 0.4) µl	→	Exonucléase I
3 µl	→	de produit de PCR
Qsp 10 µl	→	d'H ₂ O de biologie moléculaire stérile

- **Incubation dans le thermocycleur Eppendorf**

Programme : PURIFENZ

20 min à 37°C

20 min à 85°C

Tab 7: Amorces utilisées dans l'étude (Guessennd et al, 2008 ; Park et al, 2006)

Gène	Amorces	Séquences (5' → 3')	Position	La taille (pb)
QnrA	QnrA (+)	T T CTCACGCCAGGATTTGAG	339 - 358	571
	QnrA (-)	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	910 - 891	
QnrB	QnrB (+)	TGGCGAAAAAATT(GA)ACAGAA	54 - 73	594
	QnrB (-)	GAGCAACGA(TC)GCCTGGTAG	648- 630	
QnrS	QnrS (+)	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	101 - 120	388
	QnrS (-)	AACACCTCGACTTAAGTCTGA	489 - 469	
aac(6')-Ib	aac(6')-Ib (+)	ATGACTGAGCATGACCTTG	442 - 460	476
	aac(6')-Ib (-)	AACCATGTACACGGCTGG	918 - 901	
bla SHV	os-5 (+)	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	23 - 42	795
	os-6 (-)	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	818 - 799	
bla TEM	a216 (+)	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1 - 21	1079
	a217 (-)	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	1080 - 1059	
bla CTXM- Groupe1	ctxM1(+)	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	65 - 84	863
	ctxM1(-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	928 - 909	
bla CTXM- Groupe2	ctxM2(+)	ATGATGACTCAGAGCATTCG	6 -25	865
	ctxM2(-)	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	871 - 852	
bla CTXM- Groupe9	ctxM9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	6336-6355	869
	ctxM9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC	7205-7187	
CMY 2	cmy2 (+)	AATCGTTATGCTGCGCTCTGC	1934-1954	1136
	cmy2 (-)	G(CT)AGCTTTTCAAGAATGCGCC	3064-3043	
	veb (+)	ATTTCCCGATGCAAAGCGT	351-370	542

veb	veb (-)	TTATTCCGGAAGTCCCTGT	893 - 875	
dha	dhaM(+) dhaM (-)	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	1244-1265 1648-1628	405

Tab 8 : Conditions d'amplification par PCR (Guessennd et *al*, 2008 ; Park et *al*, 2006)

	Température / Temps				
	bla TEM	bla SHV, CTXM, veb,ges	AmpC (fox, cit, dha)	AAC	QnrA, B, S
Dénaturation Initiale	94 °C/5min	94 °C/5min	94 °C/3min	94 °C/5min	94 °C/5min
Dénaturation Cyclique	94 °C/1min	94 °C/1min	94 °C/30s	94 °C/1min	94 °C/1min
Hybridation	50 °C/1min	60 °C/1min	64 °C/30s	55 °C/1min	60 °C/45s
Cyclic elongation	72 °C/1min	72 °C/1min	72 °C/1min	72°C/1min	72 °C/1min
Final elongation	72 °C/1min	72 °C/7min	72 °C/7min	72°C/7min	72°C/1min
Number of cycles	30	30	25	30	30

9. Séquençage des produits PCR :

- **Principe:**

La réaction de séquence consiste en une synthèse in vitro d'ADN avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotides.

La matrice (ici un fragment d'ADN purifié) doit être présente en grande quantité (> 100 millions de copie dans le tube de réaction). Elle est mise en contact avec un mélange réactionnel comprenant d'une ADN polymérase (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 3' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de dNTP+ddNTP (figure 5).

Chaque ddNTP porte un fluorochrome spécifique (voir tableau 9). Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation (formation d'un fragment plus court que le fragment d'origine).

La synthèse d'ADN est complémentaire de la matrice initiale : donc, sur un brin de matrice, lorsqu'il existe un A, il va y avoir incorporation d'un dTTP ou d'un ddTTP fluorescent. Si le fragment de PCR initial comporte 300 A, comme la réaction est faite avec un très grand nombre de copie de la matrice, il y aura incorporation d'un ddATP à toute les positions possibles (incorporation aléatoire).

Il existera dans le tube, 300 fragments néosynthétisés, porteurs du ddTTP fluorescent et de taille différente.

Cette réaction est effectuée simultanément avec les 4 ddNTP. Ainsi, pour un produit PCR de 800 pbd, il y aura donc génération de 800 fragments fluorescents ne différant que d'une pbd. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide, et après séparation électrophorétique, un laser vient exciter le fluorochrome ce qui permet d'identifier la base correspondante. Un tracé est finalement obtenu après analyse de l'ensemble des fragments générés. (figure 6)

En général, une réaction de séquençage est effectuée sur les deux brins de l'ADN (réaction sens et reverse) : ceci permet de contrôler la présence d'une mutation au niveau de l'ADN et donc de les différencier des erreurs effectuées par l'ADN polymérase utilisée lors de la réaction de séquençage. (Tagu et al, 2003)

Tab 9 : les ddNTP et leurs fluorochrome spécifique (Tagu et al, 2003)

Didesoxyribonucléotide tri Phosphate	Fluorochrome	Couleur
--------------------------------------	--------------	---------

ddGTP	R110	noir
ddTTP*	TAMRA	rouge
ddATP	R6G	vert
ddCTP	ROX	bleu

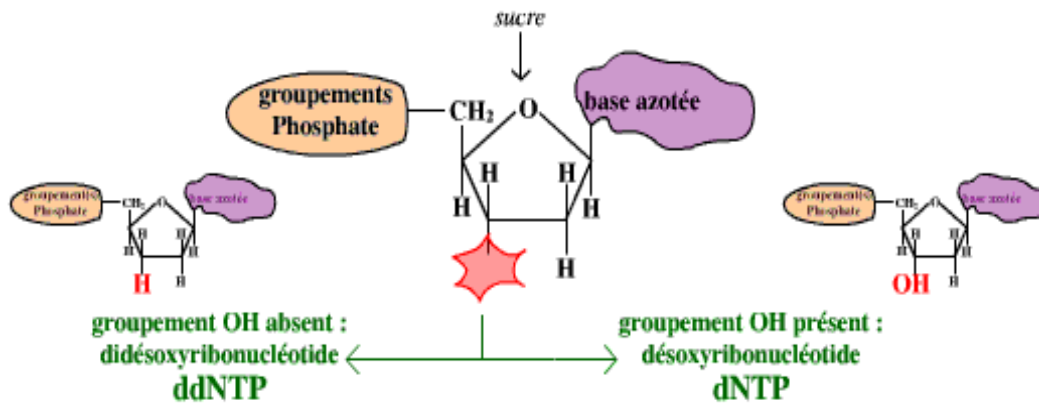


Fig 5 : Deux types de nucléotides triphosphates (Tagu et al, 2003)

- **Protocole :**

La séquence nucléotidique est déterminée grâce à l'utilisation du kit Cycle Sequencing using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.

- ✓ **Préparation du mix de la réaction de séquençage :**

Numéroter des tubes épendorff de 0,2 ml, 2 tubes épendorff par échantillon, (1 sens et 1 antisens) :

Mix big Dye terminator	→	1 µl
Primer dilué à 3,2 pmol / µL	→	1.6 µl
Tampon de séquence 5X	→	2 µl
Eau stérile QSP	→	7 µl

- ✓ **Addition du Produit de PCR purifiée : 3 µl**

- ✓ **Bien mélanger**
- ✓ **Mise en marche du thermocycleur EPPENDORF**

Utiliser le programme SEQ de 25 cycles

94 °C ———> 2 min

96 °C ———> 10 s

50°C ———> 5 s

60 °C ———> 4 min

✓ **Purification des produits PCR:**

- Ajouter 70µL d'éthanol absolu et 5 µL d'EDTA, mélanger par retournements successifs
- incuber 30 secondes à température ambiante
- Centrifuger 3300 rpm pendant 30 secondes à 14°C
- Eliminer le surnageant par retournement
- Centrifuger 300rpm à température ambiante pendant une minute la plaque à l'envers
- Ajouter 70 µL d'éthanol à 70 % (mélanger par retournement successif)
- Centrifuger 3300 rpm pendant 15 minutes à température ambiante
- Eliminer le surnageant par retournement
- Centrifuger à 300 rpm pendant 1 min la plaque à l'envers
- Laisser sécher 10 à 15 s à température ambiante pour éliminer les vapeurs d'éthanol
- addition de 20 µl de formamide déionisé
- Laisser pendant 15 minutes à l'ombre, puis faire une électrophorèse sur ABI PRISM

✓ **Interprétation des résultats**

Les séquences ont été réalisées à l'aide du séquenceur capillaire ABI PRISM R 3130 puis analysées avec le logiciel Seqscape et comparés avec le logiciel BioEdith.

Les comparaisons avec les séquences connues ont été effectuées avec le programme Blast du National Center for Biotechnology Informatioun

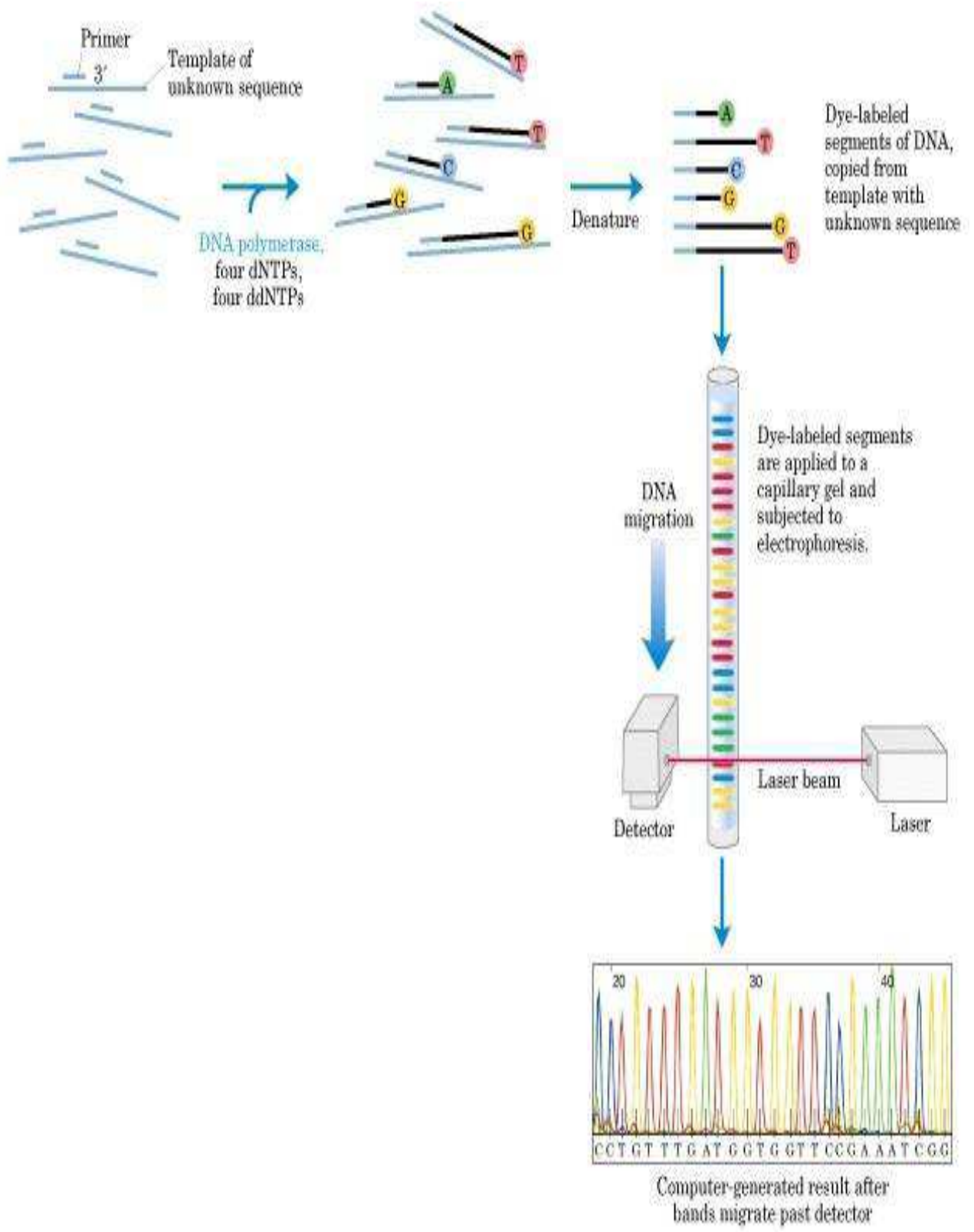


Fig 6: Séquençage automatique avec des terminateurs fluorescents (Tagu et al, 2003)

1. Conjugaison et transfert de la résistance : (Honoré et al, 2006)

La conjugaison bactérienne a été réalisée selon la méthode suivante :

A partir d'une culture de 6 heures en bouillon BHI sous agitation, mélanger les volumes 1ml / 1ml : d'une souche donatrice (souche *qnr* +) avec la souche réceptrice *E.coli* K₁₂J₅ (résistante à l'azide de sodium) puis laisser conjuguer à 37°C pendant 40 minutes.

Le choix des agents sélectionnant se fait dans le but d'éliminer les souches donatrices et les souches réceptrices qui n'ont pas reçues le plasmide conjugatif, ainsi il ne doit rester sur la boîte de sélection que les souches réceptrices portant le plasmide avec le gène de résistance dont on veut prouver le support plasmidique.

Les clones tranconjugants ont été sélectionnés sur gélose LB (Luria Bertani) supplémenté avec l'azide de sodium (200 mg/l) et la ceftasidime (2 mg/l).

Pour vérifier le transfert de la résistance, le contrôle de la sensibilité de chaque souche a été réalisé par la méthode de diffusion en gélose selon les recommandations du CA-SFM et par la détermination de la CMI par la technique de E test.

La confirmation du transfert des gènes de résistance a été réalisée par la technique de PCR.

Détermination du profil plasmidique : (Kado et Lu, 1981)

L'extraction de l'ADN plasmidique des souches *qnr* positives et de leur transconjugant a été extrait en utilisant deux solution A et B :

Solution A : 1 ml	Tris 1 M	pH 8
0.4 ml	EDTA 0.5 M	pH 8
18.6 ml	H ₂ O stérile	

Solution B: 1 ml	Tris 1 M	pH 8
3 ml	SDS 20 %	
15 ml	H ₂ O sterile	

1.025ml

NaOH 2M

Technique :

- A l'aide d'une pipette on prélève directement les colonies sur boîte (culture jeune).
- Resuspendre ces colonies dans 50 µl de solution A (cell suspension)
- Ajouter 100 µl de la solution B (solution de lyse)
- Incuber 30 à 40 minutes à 56°C, puis faire refroidir dans la glace
- Ajouter 100 µl de la solution phenol / chloroforme, puis agiter.
- Centrifuger 12000 rpm pendant 20 minutes.
- Récupérer 80 µl de surnageant
- Déposer 30 µl sur gel d'agarose à 0.75 %, laisser migrer pendant 3 heures,

Les profils plasmidiques ont été analysé après migration de 30 µl du surnageant avec un bleu de dépôt par électrophorèse en gel d'agarose à 0.75 % ; l'agarose est dissous dans le tampon TBE ×1 (Tris Borate EDTA)

L'électrophorèse est réalisée dans du tampon TBE×1 sous une tension de 90 V pendant 3 heures. Le gel est ensuite observé sous lumière UV.

La taille des plasmides a été estimé par comparaison avec des plasmides de taille connue : RP4 (54 kb) et Pip 173 (125.8 kb)

CHAPITRE 2: RESULTATS ET DISCUSSION

VIII. Prévalence de la résistance aux quinolones

L'étude montre que la dominance de la résistance aux quinolones dans le groupe des bactéries à Gram négatif revient aux non entérobactéries oxydatifs.

Les souches du genre *Acinetobacter* présentent la résistance aux quinolones la plus élevée.
(tableaux 10 et 11)

En comparant les résultats retrouvés avec celle enregistré à l'échelle nationale en 2008, nous nous notons que pour les entérobactéries en générale, les taux de résistance aux quinolones enregistré sont assez proches, à l'exception du genre *Serratia* qui a présenté dans cette étude le double du taux de résistance enregistré à l'échelle nationale en 2007.

Mais concernant, les bactéries à Gram négatif non entérobactérie, les taux retrouvé dépassent plus le double de ceux enregistré à l'échelle nationale en 2007.

Tab

Espèce	n	% S	n	I+R %	à l'échelle nationale en 2007 (OMS, 2008)	
					n / N	I+R %
<i>E. coli</i>	1028	77.64	296	22.36	475 / 2314	20.5
K <i>Klebsiella sp.</i>	876	77.25	258	22.75	115 / 653	17.6
E <i>Enterobacter sp.</i>	154	73.65	51	24.35	48 / 248	19.3
S <i>Serratia sp.</i>	140	45.01	171	54.99	23 / 85	27
P <i>Proteus sp.</i>	314	69.47	138	30.53	48 / 124	38.7
M <i>Morganella sp.</i>	55	43.65	71	56.35	ND	
P <i>Providencia sp.</i>	13	68.42	06	31.58	ND	
<i>Citrobacter sp.</i>	19	82.60	04	17.40	ND	
<i>Salmonella sp.</i>	46	79.31	12	20.69	5 / 20	25

10 :

Prévalence de la résistance des entérobactéries à l'acide nalidixique à Annaba et à L'échelle nationale en 2007

R : resistant; S : sensible; I : intermédiaire ; ND : non disponible

Tab 11 : Prévalence de la résistance des bactéries à Gram négatif non entérobactérie à la péfloxaciné à annaba et à L'échelle national en 2007

Espèce	n	% S	n	% I+R	à l'echelle nationale (OMS, 2008)	
					n / N	I+R %
<i>Pseudomonas sp.</i>	398	50.04	392	49.96	136 / 1055	12.8
<i>Acinetobacter sp.</i>	125	40.98	180	59.02	67 / 238	28.1

IX. Evolution de la résistance aux quinolones

L'étude montre que pour les entérobactéries il ya eu une élévation continue de la résistance aux quinolones, ainsi le taux de résistance a passé de 18.62 % en 2004 à 42.02 % en 2008.

Pour les bacilles à Gram négatif non entérobactéries (BGN-NE), il ya eu une diminution du taux de résistance en 2005, puis on a noté une augmentation continue jusqu'à 2008.

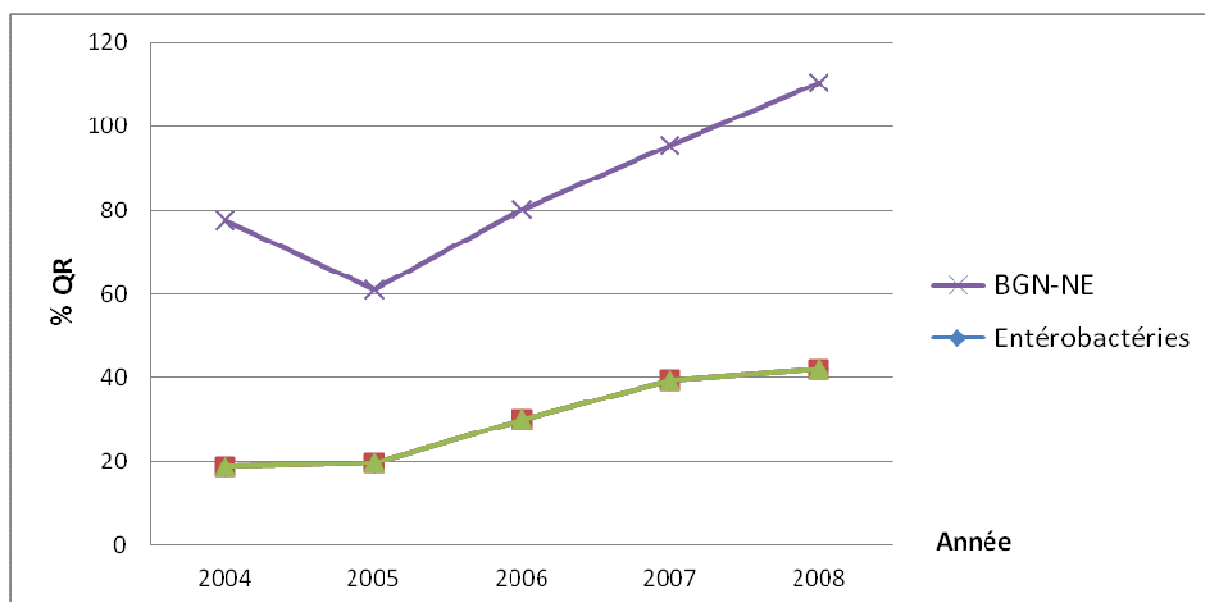


Fig7 : Evolution de la résistance aux quinolones pendant la période d'étude

X. Caractérisation du phénotype de résistance aux antibiotiques des souches résistantes aux quinolones :

Concernant le phénotype de résistance aux quinolones; on note que les deux phénotypes de résistance : Pht II (Nal R/ Pef S) et Pht III (Nal R/ Pef R) sont exprimés presque avec le même taux $\approx 17\%$ (tableau 12).

Les fréquences de résistance des souches dites QR aux autres familles d'antibiotiques sont présentées dans les tableaux 13 et 14.

L'analyse de leurs profils de résistance montre que ces souches présentent une résistance à au moins quatre antibiotiques, ce qui fait d'elles des souches multi résistantes

Tab 12 : Répartition des souches d'entérobactérie selon leurs phénotypes de résistance aux quinolones.

Espèce	Pht I		Pht II		Pht III	
	S	S	R	S	R	R/I
	Nal	Pef	Nal	Pef	Nal	Pef
	n	%	n	%	n	%
<i>E. coli</i>	410	75,22	71	13,02	62	11,73
<i>Klebsiella. sp</i>	335	70,08	70	14,64	71	14,85
<i>Enterobacter. sp</i>	24	53,33	11	24,44	10	22,22
<i>Serratia. sp</i>	30	26,08	36	31,30	49	42,60
<i>Proteus. sp</i>	56	53,84	24	23,07	24	23,07
<i>Morganella. sp</i>	25	33,33	28	37,33	19	25,33
<i>Providencia. sp</i>	06	66,66	02	22,22	1	11,11
<i>Citrobacter. sp</i>	11	84,61	02	15,38	-	-
<i>Salmonella. sp</i>	18	72	04	16	3	12
Total	915	64,93	248	17,60	239	16,96

Pht : phénotype S: sensible I: intermédiaire R: résistante Nal: acide Nalidixique, Pef : Péfloxacine

Antibiotiques	<i>E. coli</i> n =81 R (%)	<i>Klebsiella</i> <i>spp</i> n =75 R (%)	<i>Enterobacter</i> <i>Spp</i> n =22 R (%)	<i>Serratia Spp</i> n =74 R (%)	<i>Proteus Spp</i> n =90 R (%)	<i>Morganella Spp</i> n =21 R (%)
Ampicilline	92.41	-	-	-	90	-
AMC	45.57	52.38	-	-	50	-
Cefazoline	30.38	67.86	95.24	97.22	72.22	94.12
Cefotaxime	27.87	60.71	42.86	87.5	40	70.56
cefoxitine	6.33	16.67	61.90	69.44	18.89	38.24
Imipénème	7.59	13.10	14.29	16.67	15.56	11.76
Gentamicine	11.39	40.48	52.38	69.44	13.33	29.41
Kanamycine	2.53	25	4.76	2.78	5.56	8.82
Chloramphinico	13.92	7.14	14.29	1.39	16.67	8.82
SXT	56.96	59.52	52.38	51.39	46.67	52.94
Colistine	31.65	9.52	9.52	-	-	-
Ticarcilline	87.34	-	71.43	84.72	77.78	73.53
Nitrofurane	34.18	44.05	42.86	63.86	-	-

AMC : Amoxicilline+Acide clavulanique ; SXT : Trimethoprim + Sulfamethoxazole

Tab13 : Résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones

Tab14: Résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas spp* et d' *Acinetobacter spp* résistantes aux quinolones

Antibiotiques	<i>Pseudomonas spp</i> n = 184 R (%)	<i>Acinetobacter spp</i> n = 87 R (%)
Ticarcilline	71.82	91.67
Piperacilline	22.65	88.54
Tobramycine	34.81	59.38
Amikacine	15.47	25
Imipénème	10.50	8.33
Ceftazidine	17.13	62.50
Aztréonam	7.18	13.54

XI. Etude de la résistance aux quinolones par prélèvement :

L'étude de la population bactériennes sélectionnée laisse apparaître une nette prédominance des souches QR isolées de pus divers avec un taux de 37,01 %, suivie des souches isolées des prélèvements divers avec 35.45 % de QR;

Les souches isolées de ponctions (ponction lombaire, ponction d'ascite et liquide pleurale), du sang et des urines présentent des pourcentages de résistance assez proches qui sont respectivement : 21.6 %, 19.58 % et 17.91 %.

Tab 15 : Pourcentages de résistance aux quinolones par prélèvement

		Urine	Sang	Ponction	Pus	Prélèvement divers
Entérobactéries	<i>E. coli</i>	12,7	9,3	0	23,25	25
	<i>Klebsiella spp</i>	11,5	23,8	24,6	24,6	25
	<i>Enterobacter spp</i>	12,76	6,25	16,66	21,17	19,04
	<i>Serratia spp</i>	71,42	26,92	16,66	45,28	39,53
	<i>Proteus spp</i>	18,08	26,92	11,11	30,09	27,27
	<i>Morganella spp</i>	28,57	0	0	50	0
	<i>Providencia spp</i>	-	-	0	42,85	0
	<i>Citrobacter spp</i>	0	0	-	33,33	-
	<i>Salmonella spp</i>	16,16	13,63	0	50	0
<i>Pseudomonas spp</i>		46,29	46,66	42,1	42,78	60,95
<i>Acinetobacter spp</i>		53,12	37,5	50	63	56,41

XII. Etude de la résistance aux quinolones par service hospitalier:

L'analyse des résultats de l'étude de la sensibilité aux quinolones au niveau des différents services hospitaliers montre que le service d'endocrinologie est le plus touché par cette résistance ainsi 47.86 % des souches isolées sont QR.

En deuxième position figure le service d'urologie avec 41.33 % de souches sont QR, suivie par le service de maladies infectieuses et de réanimation qui présentent respectivement 36.47 % et 35.97 % de souches sont QR

Les services d'oto-rhino-laryngologie, de pneumologie et de néphrologie présentent respectivement des taux de souches QR : 33.91%, 28.27% et 26.33 %.

XIII. Caractérisation moléculaire des souches résistantes

4. Analyse phénotypique des souches étudiées :

Les souches étudiées ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à l'acide nalidixique; La majorité des souches (13/25) ont été isolées des urines.

Le service endocrinologie semble être le plus incriminé: 11/25 des souches proviennent de ce service. Les souches des patients externes représentent 28% des souches étudiées suivie du service de chirurgie (4/25) puis d'urologie (2/25).

L'analyse du profil de résistance aux antibiotiques des souches étudiées montre que 24 souches présentent une résistance à au moins quatre antibiotiques et que la totalité des souches étudiées étaient sensible à l'imipinème (tableau 16).

Les taux de résistance les plus élevés sont obtenus pour l'amoxicilline suivie de triméthoprime sulfaméthoxazole puis tétracycline, gentamicine et ciprofloxacine.

Six souches montrent une résistance aux céphalosporines de troisième génération avec un phénotype de BLSE

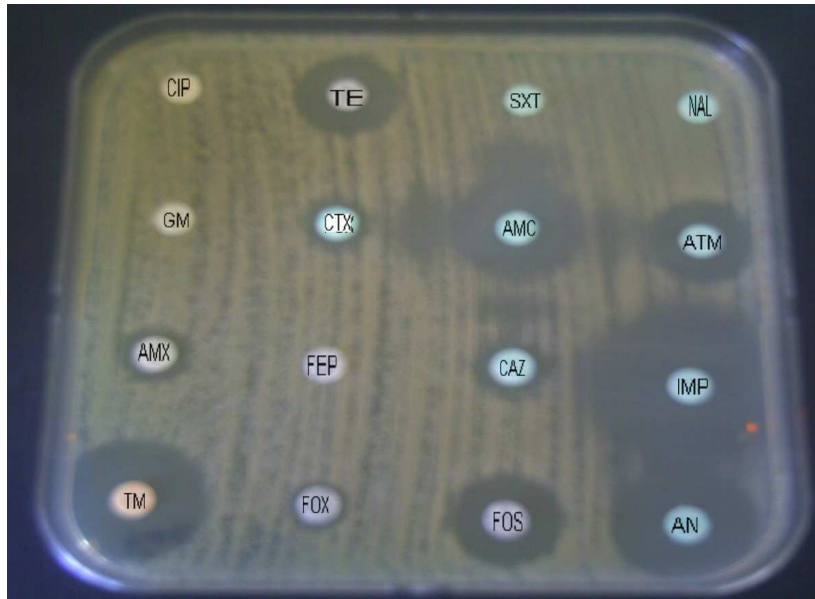


Fig 8: Antibiogramme de la souche S17: *Klebsiella pneumoniae* productrice de beta-lactamase à spectre étendue

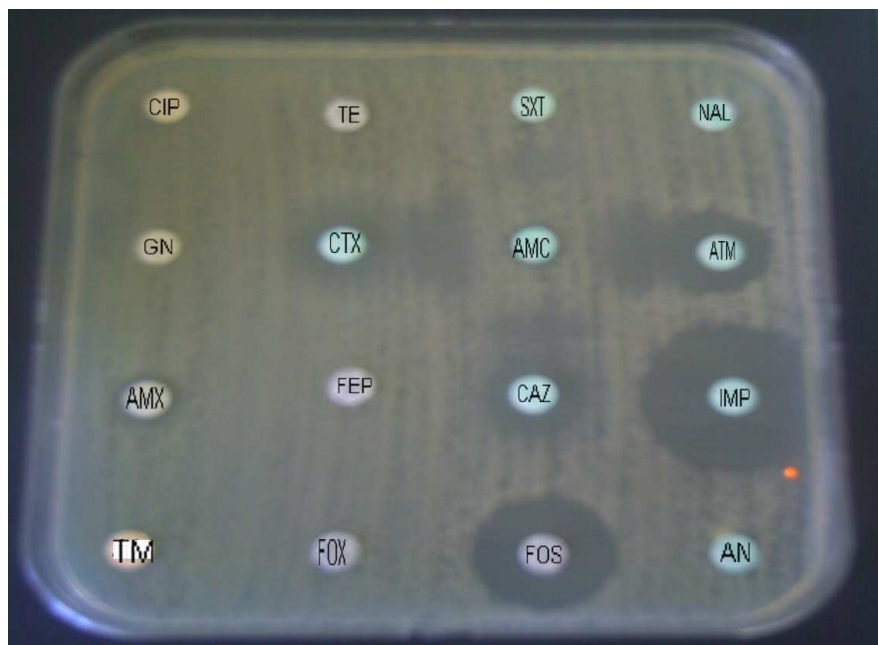


Fig 9: Antibiogramme de la souche S14: *Enterobacter cloacae* productrice de beta-lactamase à spectre étendue

Abréviations : AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline / acide clavulanique, ATM : Aztreonam ; CAZ : Ceftazidime, FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, IPM : imipénème, GM : gentamicine, AN : amikacine, SXT : triméthoprime/ sulfaméthoxazole, NAL : acide nalidixique, FOS : fosfomycine, CIP : ciprofloxacine, FEP : pefloxacine, TE : tetracycline, TM : tobramycine.

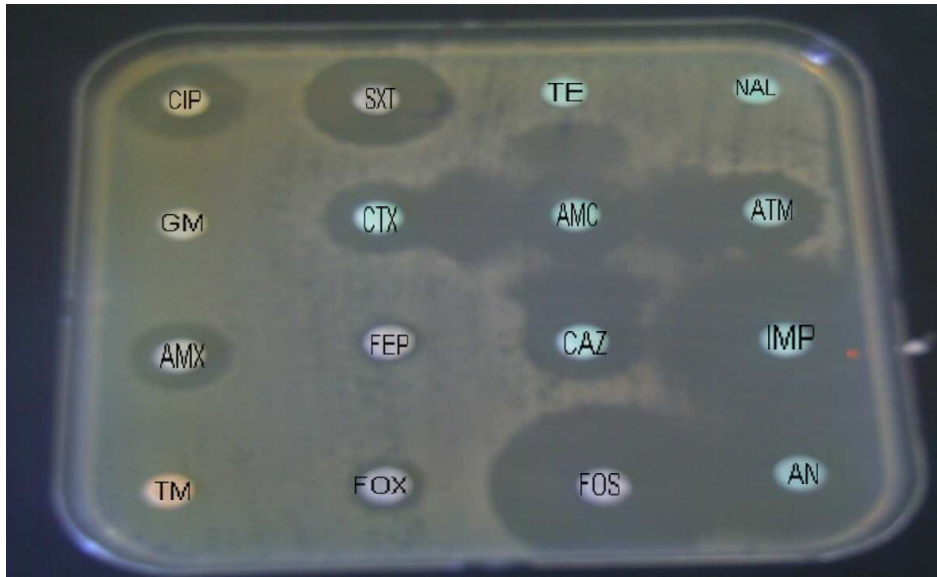


Fig 10 : Antibiogramme de la souche S2: *Klebsiella pneumoniae* productrice de beta-lactamase à spectre étendue

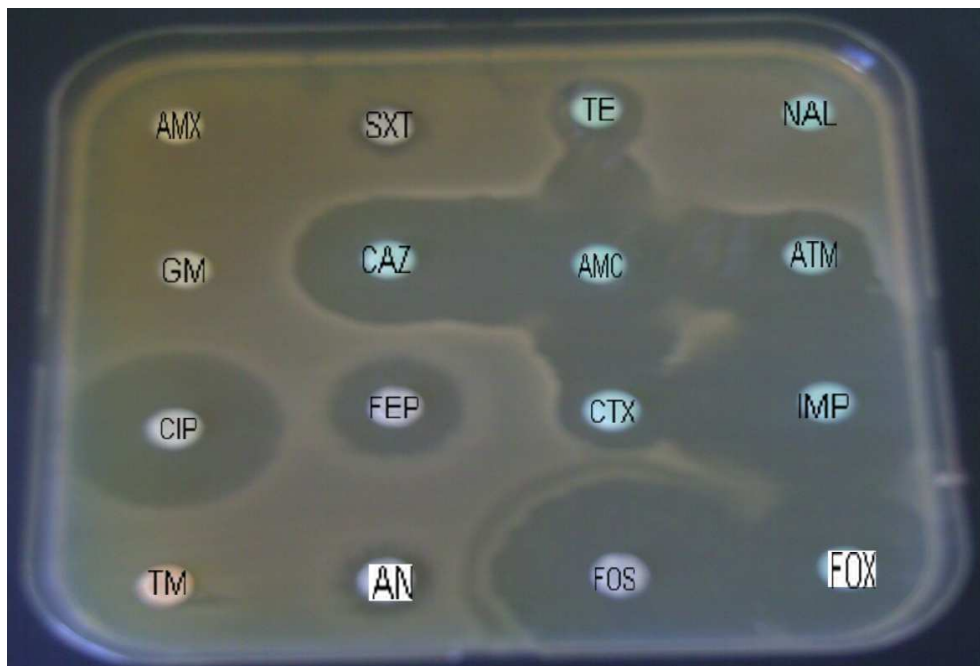


Fig 11 : Antibiogramme de la souche S4: *Proteus mirabilis* productrice de beta-lactamase à spectre étendue

Abréviations : AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline / acide clavulanique, ATM : Aztreonam ; CAZ : Ceftazidime, FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, IPM : imipénème, GM : gentamicine, AN : amikacine, SXT : triméthoprime/ sulfaméthoxazole, NAL : acide nalidixique, FOS : fosfomycine, CIP : ciprofloxacine, FEP : pefloxacine, TE : tétracycline, TM : tobramycine.

5. Mécanismes moléculaires de résistance aux quinolones :

L'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques montrent que les BLSE exprimées sont de type TEM (5 / 6), SHV (2 / 6), et CTXM du groupe 1 (4 / 6), aucune bla de type CTX M groupe 2, 8 et 9, n'a été détectées, et aucune souche ne produisait les céphalosporinases de type AmpC testées (DHA, CMY, CIT, FOX, VEB.) Quatre souches sur six exprimaient au moins deux types de Béta-lactamase (Tableau 16) (figure 17 et 18)

Le criblage du gène *aac* (6')-Ib montre que ce gène était présent dans trois souches des 25 étudiées et qui étaient aussi productrice d'une BLSE. Les réactions de séquençage indiquent la présence du variant *aac* (6')-Ib-cr dans l'une des souches (Tableau 16 et 18) (figure 16).

La recherche de souches porteuses des gènes *qnr* parmi les souches étudiées montre que deux souches (2 / 25) sont *qnr* B positives qui s'avèrent être le variant *qnr*B1 après séquençage. Les gènes *qnr* A et *qnr* S n'ont pas été détectés (figure 14).

Les deux souches *qnr* B positives (S14: *Enterobacter cloacae* et S17: *Klebsella pneumoniae*) sont multi-résistantes par production de BLSE.

Ces deux souches *qnr* B positives présentent un très haut niveau de résistance à l'acide Nalidixique (CMI > 256 µg/ml) à la ciprofloxacine (CMI > 32 µg/ml) et à toutes les Céphalosporines testées avec des CMI > 256 µg/ml.

Ces deux souches sont aussi résistantes à la gentamycine et à la tobramycine mais le niveau de résistance est différent, ainsi la souche S14: *Enterobacter cloacae* présente un très haut niveau de résistance avec des CMI > 256 µg / ml pour toutes les aminosides testées.

Par contre pour la souche S17 la CMI vis à vis de ces aminosides oscille entre 8 et 128 ug/ml (Tableau 17)

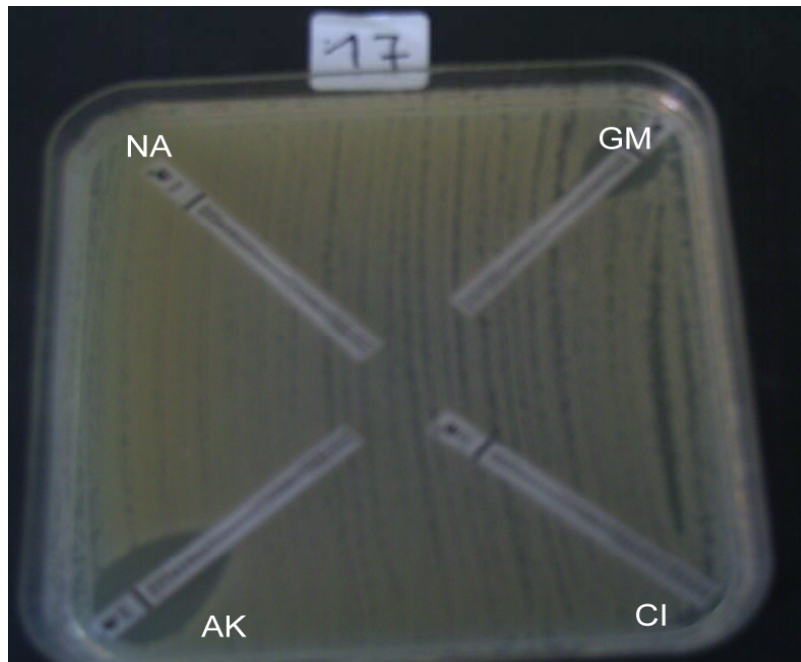


Fig 12 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche S 17: *Klebsiella pneumoniae*

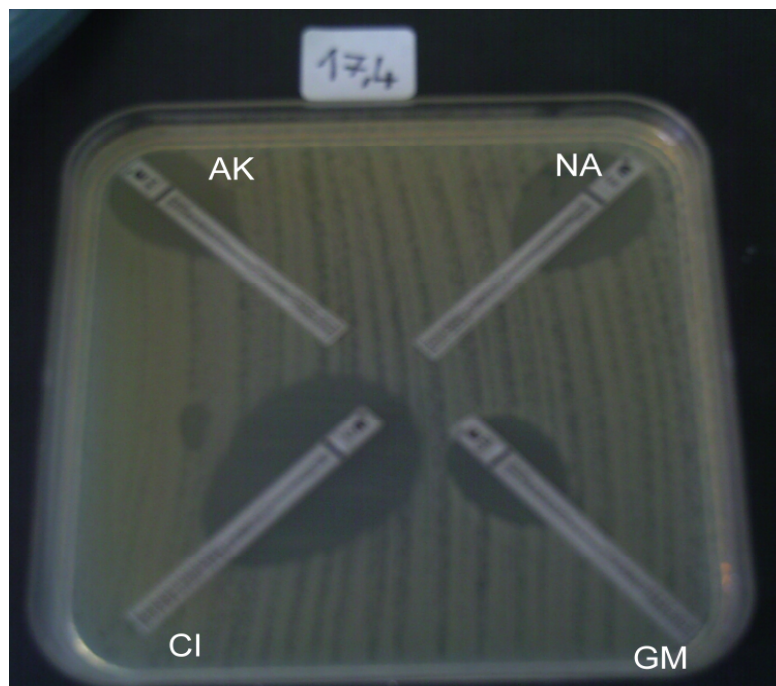


Fig 13 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche transconjugante Tc 17

AK : 0.16 - 256 µg / ml
CI : 0.02 - 32 µg / ml
GM: 0.16 - 256 µg / ml
NA: 0.16 - 256 µg / ml

6. Etude du transfert de la résistance aux quinolones :

Afin de déterminer la transférabilité du plasmide portant le gène qnr et examiner une éventuelle association des gènes qnr et les BLSE des souches qnr positives, des expériences de conjugaisons ont été réalisées en utilisant la souche d' *E.coli* K12J5 résistante à l'azide de sodium comme souche réceptrice.

Après criblage des transconjugants sur milieu sélectif, les réactions de PCR montrent que les transconjugants hébergeaient le gène qnr (figure 15).

Deux transconjugants Tc14 et Tc17 obtenus respectivement des isolats 14 et 17 étaient résistants à l'amoxicilline, ceftazidime, céfotaxime, cefoxitine et céfépime et montrent une diminution de sensibilité à la tobramicine et gentamicine.

Ceci indique un co-transfert des gènes de bêta-lactamases et d'aminoglycosides.

Ce résultat phénotypique concorde avec les résultats d'amplification des gènes de résistances de BLSE et de aac (6')-Ib chez les transconjugants. (Tableau 17) (Figure 16, 19 et 20). Tous les transconjugants ont révélé une diminution de sensibilité vis-à-vis des quinolones comparativement à la souche d'*E.coli* K12J5.

Le niveau de résistance aux quinolones transférés par le gène qnr est relativement faible, puisque l'augmentation des CMI des quinolones n'est que de 2 à 48 fois par rapport aux CMI mesurées vis-à-vis de la bactérie réceptrice *E.coli* K12J5. Cette augmentation est peu visible sur l'antibiogramme par diffusion.

L'analyse du contenu plasmidique des souches hébergeant le gène qnr et de leurs transconjugants montre que les gènes de résistance aux quinolones (qnr, aac (6') Ib-cr) et la *blaCTM1* sont portés par un même plasmide de haut poids moléculaire (>125 kb) (Figure 21), par contre le gène SHV11 de la souche S17 semble être porté par un autre plasmide autre que celui portant les gènes de résistance aux quinolones.

Tab16 : caractérisation des 26 souches résistantes à l'acide nalidixique

code	souches	Qnr	aac ('6)Ib	Gènes d' ESBL	Profil de résistance aux antibiotiques
1	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	aac ('6)Ib	TEM SHV	Nal SXT TE AN ATM TM GM CTX CAZ AMX
2	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	-	-	TEM CTXM1	Nal CIP TE ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	CTXM1	Nal TE AN TM GM AMC CTX FOX AMX
4	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	TEM	Nal SXT TE AN ATM GM CTX CAZ FEP AMX
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal SXT TE TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX
6	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal SXT TE AN GM CTX AMX
7	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal SXT TE GM AMC FOS FOX AMX
8	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal SXT TE GM AMC CTX AMX
9	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMX
10	<i>Morganella morgani</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMX
11	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMC FOS AMX
12	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	Nal SXT TE AN GM CTX AMX
13	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal SXT TE AMC FOS AMX
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	B	aac ('6)Ibcr	TEM CTXM1	Nal SXT CIP TE AN ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX FOX
15	<i>Morganella morgani</i>	-	-	-	Nal TE GM FEP AMX
16	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE GM AMX FOX
17	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	B	aac ('6)Ib	TEM SHV CTXM1	Nal SXT CIP ATM TM GM CTX CAZ FEP AMX
18	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AN ATM GM AMC CTX CAZ FOS FEP AMX FOX
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMX
20	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE GM AMX
21	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE GM AMX
22	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal
23	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	Nal TE AMX
24	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMX
25	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE AMX
26	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	Nal SXT CIP TE TM GM AMC AMX

Tab 17: Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : *qnr* et leurs transconjugants

Souches	Les gènes de résistance	Profil de résistance	CMI (mg / µl)								
			Nal	Cip	CTX	CAZ	FEP	Fox	G	Ak	Tb
Recipient K ₁₂ J ₅	-	-	3	0.02	0.5	1	0.75	8	0.09	0.5	0.3
14	TEM1 CTXM28 QnrB 1 aac(6)Ibcr	Nal SXT CIP TE AN ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX FOX	>256	>32	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
E 14	TEM1 CTXM28 QnrB 1 aac(6)Ibcr	Nal SXT CIP TE ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX FOX	>256	>32	>256	>256	>256	>256	16	2	8
17	TEM1 CTXM28 SHV11 QnrB 1 aac(6)Ib	Nal SXT CIP ATM TM GM CTX CAZ FEP AMX	>256	>32	>256	>256	>256	16	64	8	128
E 17	TEM1 CTXM28 QnrB 1 aac(6)Ib	ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX	6	0.94	>256	128	>256	12	16	3	6

Tab 18: Résultats du séquençage des gènes

Souches	Qnr B variant	QnrS variant	AAC variant	SHV	TEM	CTXM
17	B1	-	aac(6')Ib	SHV11	TEM1	CTXM 28
E 17	B1	-	aac(6')Ib	Non transférer	TEM1	CTXM 28
14	B1	-	aac(6')Ib-cr	-	TEM1	CTXM 28
E 14	B1	-	aac(6')Ib-cr	-	TEM1	CTXM 28

MW 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 T- A B S MW

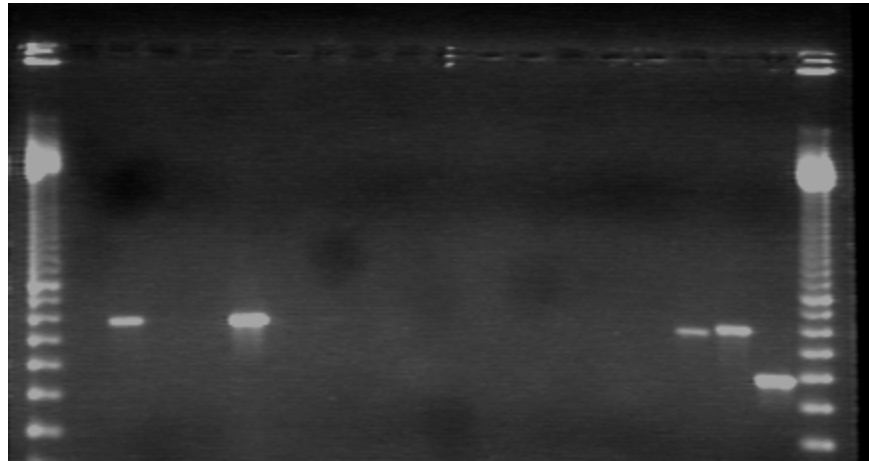


Fig 14 : Détection par PCR Multiplex du gène *qnr* à l'aide de trois couples d'amorces spécifiques du gène *qnrA*; *qnrB*; *qnr S*

MW B+ T- 14 Tc14 17 Tc17 T- B+ MW

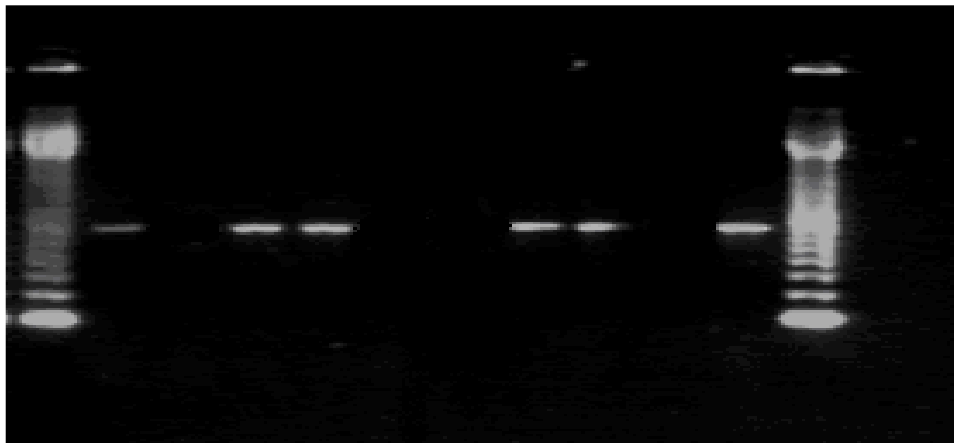


Fig 15: Détection par PCR simplex du gène *qnr* à l'aide d'amorces spécifiques du gène *qnrB*; chez les souches *qnr B* positif et leurs transconjugants

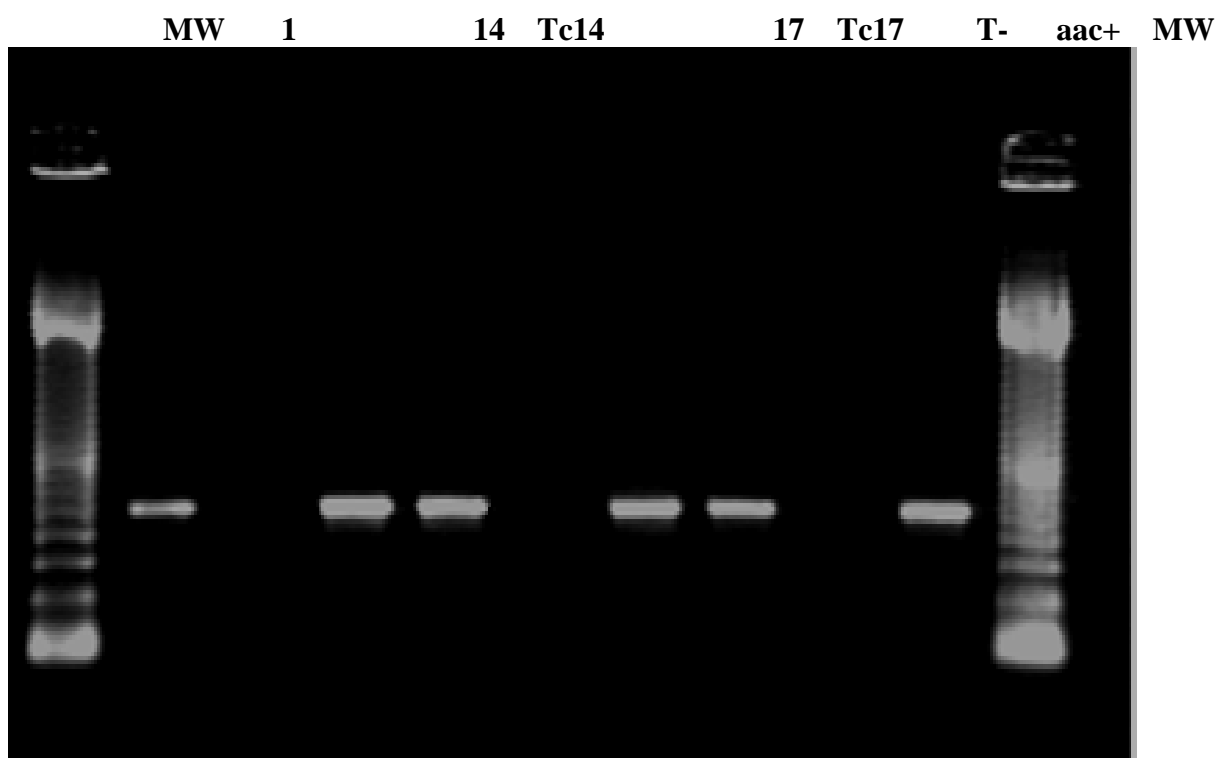


Fig16: Détection par PCR simplex du gène *aac*; chez les souches *aac* positif et les transconjugants des souches *qnrB* positif

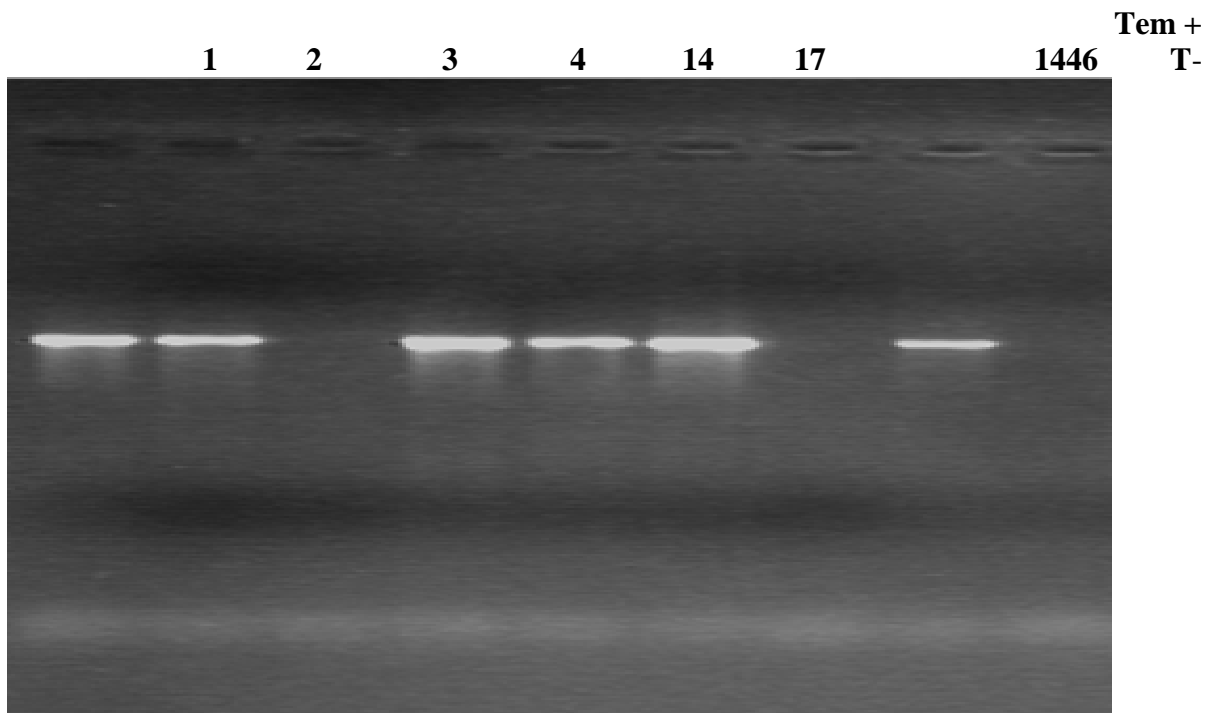


Fig 17: Détection par PCR simplex du gène *Tem* chez les souches BLSE positif

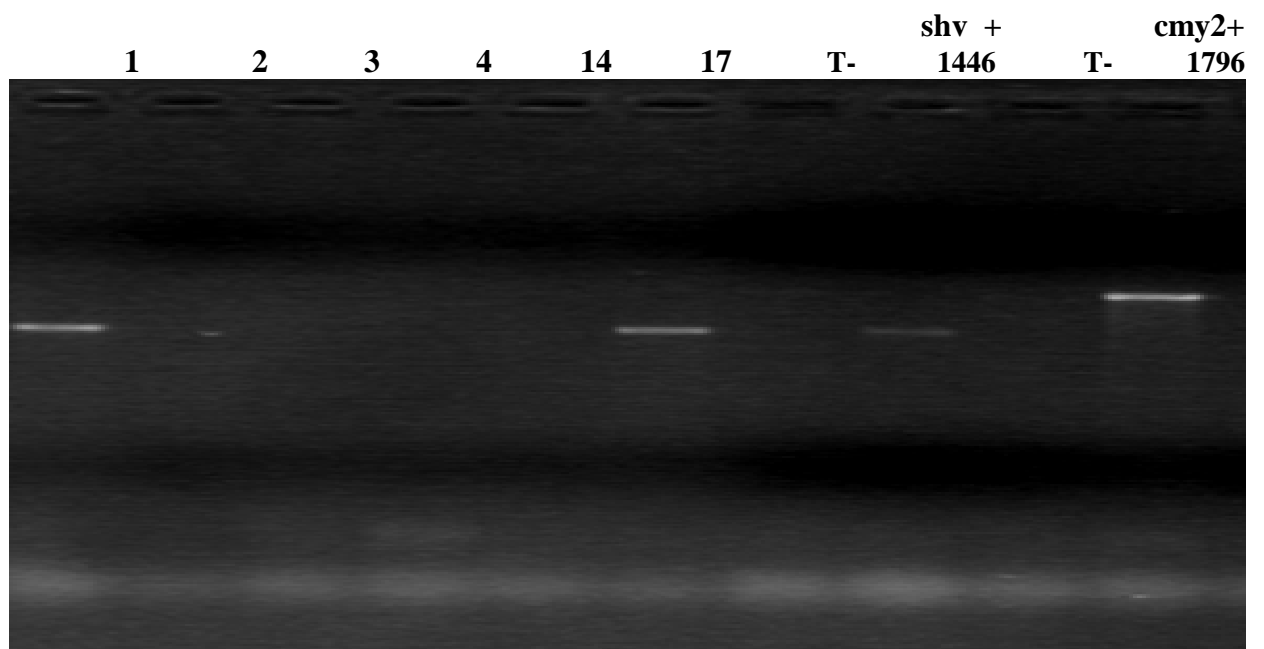


Fig 18: Détection par PCR simplex du gène *shv* chez les souches BLSE positif

TEM

SHV

MW 14 Tc14

17 Tc17 T- 1446

17 Tc17 T- 1446 MW

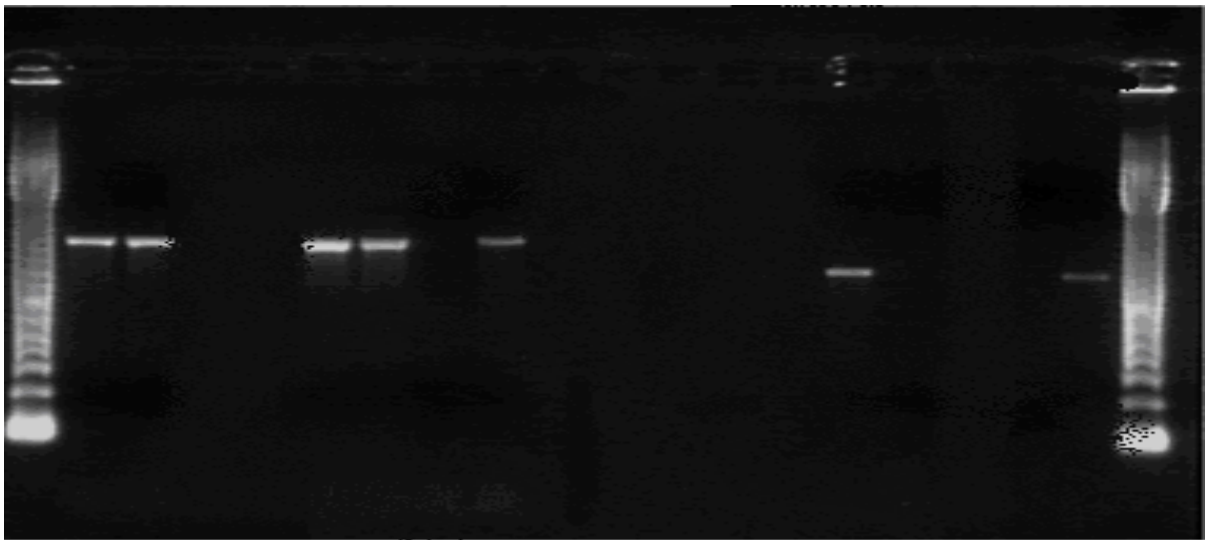


Fig 19 : Détection par PCR simplex du gène *Tem* et *shv* chez les souches qnr positif et leurs transconjugants

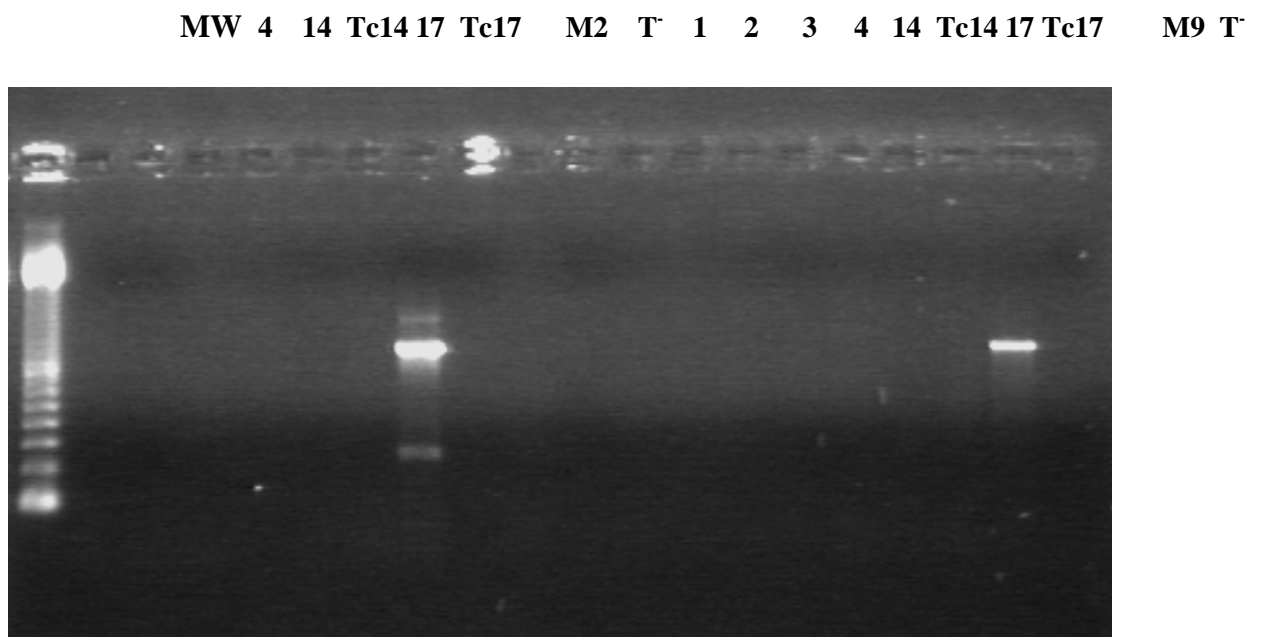
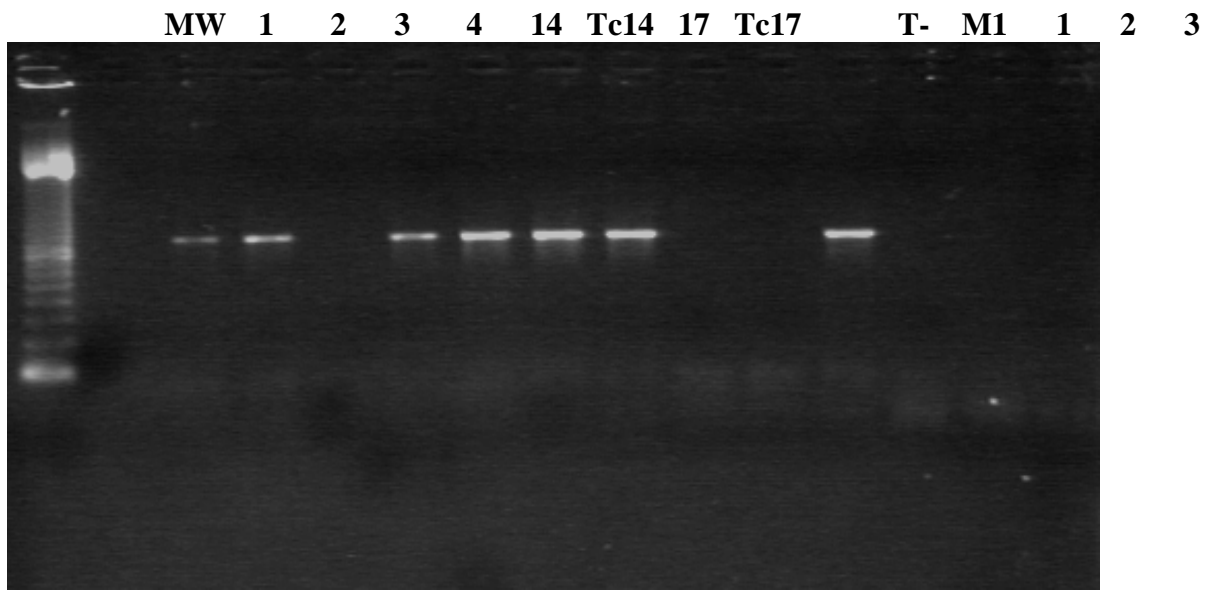
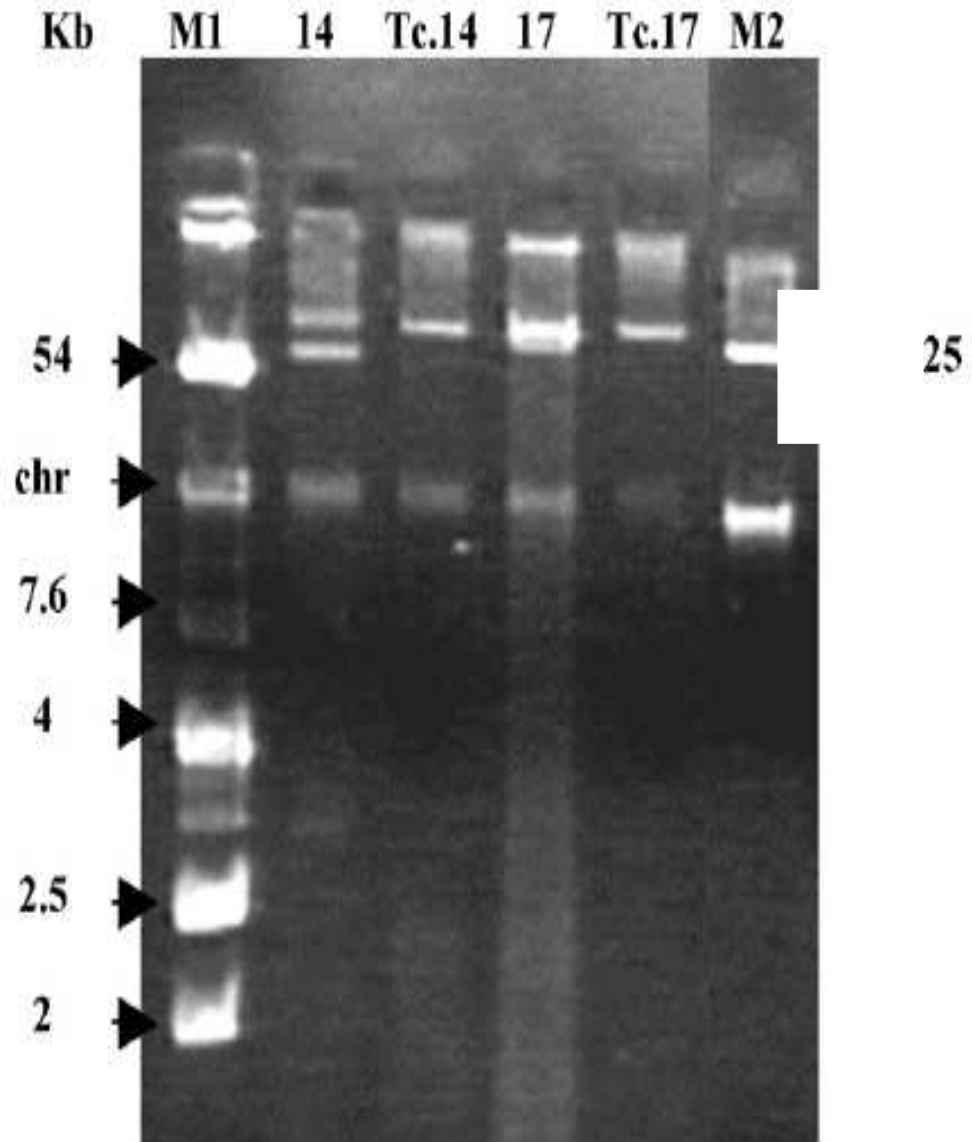


Fig 20: Détection par PCR simplex du gène *CTXM1*, *CTXM2*, *CTXM9* chez les souches BLSE positif et les transconjugants des souches qnr B positif



M1 (*E. coli* V517) et M2 (plasmide pIP 173) : témoin de poids moléculaires.

Fig 21 : Photo du profil plasmidique des souches *qnr* positives (S14 et S17) et leurs transconjugants (Tc.14 et Tc17).

XIV. Discussion

Les fréquences de résistance aux quinolones enregistrées à Annaba, sont en générale en concordance avec celle enregistré dans le 9ème rapport d'évaluation de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie publié par l'OMS en 2008; ainsi pour les entérobactéries, les taux de résistance aux quinolones enregistré sont assez proches, à l'exception du genre *Serratia* qui a présenté dans notre étude le double de celui enregistré à l'échelle nationale. Mais concernant, les bactéries à Gram négatif non entérobactérie, on note un taux de résistance aux quinolones nettement plus important que celui enregistré à l'échelle nationale.

Les souches QR sont plus isolées des prélèvements de pus divers avec un taux de 37,87 %, Claude Martin et *al.*, 1992 ont donné comme explication à cette résistance que la présence de nombreux fragment d'ADN dans le pus peut « piéger » l'antibiotique, diminuant ainsi la quantité disponible pour agir sur les bactéries.

Les souches QR présentent une poly résistance aux antibiotiques, Sahm et *al.*, ont trouvé aussi que la résistance aux quinolones est toujours associée à plusieurs autres familles d'antibiotiques et parmi les explications données pour ce phénomène est la co- sélection par les autres familles d'antibiotiques à spectre large tel que la vancomycine et les aminosides. Une autre explication, c'est le mécanisme de résistance par efflux qui confer à la bactérie la résistance à plusieurs antibiotiques. (Sahm et *al.*, 2001)

Quoique la recherche des gènes *qnr* est souvent effectuée chez les entérobactéries productrices de betalactamases, certaines études ont rapporté la présences de ces gènes chez des souches non BLSE et chez des souches résistantes à la l'acide nalidixique et /ou fluoroquinolones avec ou sans une production de BLSE (Mammeri et *al.*, 2005 ; Wang, 2003)

Notre étude, a permis d'identifier deux souches portant le gène *qnr* B1 sur 25 souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique testées au niveau de l'hôpital d'Annaba.

D'autre part, cette étude vient de décrire pour la première fois en Algérie une souche d'*Enterobacter cloacae* (S14) résistante aux fluoroquinolones porteuse de deux mécanismes plasmidiques de résistance aux quinolones : *qnr* B1 et *aac* (6)-Ib-cr.

Les deux souches exprimant le gène *qnr* B1 rapportées dans cette étude sont productrices de bêta-lactamases à spectre élargie.

La souche S14: d'*Enterobacter cloacae* héberge différents gènes bêta-lactamases : *bla* TEM1 et CTX-M 28, et la souche S17 contient *bla*TEM1, CTX-M-28 et SHV11.

Ainsi, c'est la première détection en Algérie du gène CTX-M-28 et la deuxième en Afrique après la Tunisie (Ben Achour et al, 2009) et c'est aussi la première détection du gène SHV11 en Algérie. En effet les études relatives à la prévalence et à la diversité des BLSE des entérobactéries isolées en Algérie ont montré la présence du *bla* CTX M-3 et CTXM-15 (Messai et al, 2008 ; Touati et al, 2008)

Nos souches *qnr* positives montrent une résistance aux aminoglycosides, cotrimoxazole, cefotaxime, ceftazidime et cefepime.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le support plasmidique de la résistance aux quinolones est associée à des intégrons portant des déterminants de résistance à plusieurs autres antibiotiques comme les bêta-lactamines et les aminoglycosides (Li, 2005). Ceci est confirmé dans notre étude par la présence de ces résistances chez les transconjugants obtenus à partir des souches *qnr* positifs.

Beaucoup d'études basées sur des approches moléculaires ont montré l'association entre les déterminants de la résistance aux quinolones et la production de BLSE.

(Poirel, et al, 2006 ; Ambrozic Avgustin et al, 2007 ; Rodriguez-Martinez et al, 2008)

Dans notre étude les souches *qnr* sont associées à au moins deux types de gènes *bla*, ce constat a été également fait à Abidjan en Côte d'Ivoire où 30 / 41 des souches *qnr* produisent au moins deux types de gènes *bla*. (Guessennd et al, 2008)

Le gène *qnr* B1 identifié dans nos souches est associé au gène de BLSE CTX –M-28. Contrairement aux autres souches décrites en Algérie montrant une association entre la *bla* CTX M-15 et le gène *qnr*B1 ou S1. (Messai et al, 2008 ; Touati et al, 2008).

De même un clone d'*Enterobacter Cloacae* exprimant à la fois les gènes *qnr* S1 et B4 en association avec la *bla* SHV12 a été rapporté en Algérie (Iabadene et al, 2008)

La coexistence des différents bêta-lactamases dans une même bactérie peut poser un problème de diagnostic et de thérapeutique (Roh et al, 2008).

Ces associations conduisent à une cosélection des gènes de résistance et au scénario de pandémie à l'hôpital et en communauté (Canton et al, 2006) et expliqueraient en partie la coexistence entre la

résistance aux fluoroquinolones et la production de BLSE chez les entérobactéries (Nordman *et al*, 2005)

Les deux souches qnr rapportées dans notre étude présentent un très haut niveau de résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine, ce qui suggère la présence d'autres mécanismes de résistance tel que des mutations chromosomique dans les gènes codant pour l'ADN gyrase et la pompe à efflux (Gu *et al*, 2004 ; Hooper, 1999) et qui n'ont pas été évalué dans cette étude.

La caractérisation moléculaire des tansconjugants issus de la souche S14 et S17 et l'étude de leurs profil plasmidique montrent que les gènes CTXM 28, qnr B1 et aac ('6) Ib-cr sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire dépassant les 125 kb. Beaucoup d'études ont rapporté des plasmides conjugatifs dont poids moléculaire varie entre 40 et 320 kb comme support des gènes de résistances aux BLSE et aux quinolones (Mammeri *et al*, 2005 ; Wang *et al*, 2003 ; Ambrozic Avgustin *et al*, 2007 ; Fihman *et al*, 2008)

Bien que la technique de PCR multiplex utilisée dans cette étude a permis d'identifier les gènes qnrA, B et S ; elle reste néanmoins limitée. En effet les amorces utilisées ne permettent pas de cribler la totalité des variants qnr décrit jusqu'à présent. De même d'autre gènes de résistance plasmidique aux quinolones sont récemment décrit qnr C et qnr D (Wang *et al*, 2009 ; Cavaco *et al*, 2009) et qui ne sont amplifiables par ces amorces.

CONCLUSION

L'étude de la résistance des bacilles à Gram négatif eu centre hospitalier, sur la période d'étude du 1^{er} janvier 2004 à la fin 2008, a montré que pour les entérobactéries, les taux de résistance aux quinolones enregistré sont assez proches, à l'exception du genre *Serratia* qui a présenté dans notre étude le double de celui enregistré à l'échelle nationale (OMS, 2008). Mais concernant, les bactéries à Gram négatif non entérobactérie, on a noté un taux de résistance aux quinolones nettement plus important que celui enregistré à l'échelle nationale.

Notre étude, a permis d'identifier deux souches portant le gène *qnr B1* sur 26 souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique testées au niveau de l'hôpital d'Annaba. Ces deux souches *qnr B* positives (S14: *Enterobacter cloacae* et S17: *Klebsella pneumoniae*) sont multi-résistantes par production de BLSE.

D'autre part, cette étude vient de décrire pour la première fois en Algérie une souche d'*Enterobacter cloacae* (S14) résistante aux fluoroquinolones porteuse de deux mécanismes plasmidiques de résistance aux quinolones : *qnr B1* et *aac (6)-Ib-cr*.

La souche S14: d'*Enterobacter cloacae* héberge différents gènes betalactamases : *bla TEM1* et *CTX-M 28*, et la souche S17 contient *blaTEM1*, *CTX-M-28* et *SHV11*.

Ainsi, c'est la première détection en Algérie du gène *CTX-M-28* et la deuxième en Afrique après la Tunisie (Ben Achour et al, 2009) et c'est aussi la première détection du gène *SHV11* en Algérie. En effet les études relatives à la prévalence et à la diversité des BLSE des entérobactéries isolées en Algérie ont montré la présence du *bla CTX M-3* et *CTXM-15* (Messai et al, 2008 ; Touati et al, 2008)

L'émergence de nouveaux mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones constitue une vraie menace concernant l'efficacité des fluoroquinolones, et ce, à plusieurs niveaux.

D'abord, leur présence sur des plasmides conjugatifs favorise leur mobilité et leur dissémination chez les différents pathogènes.

En plus, leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement les bêtalactamines et aminosides, concourt à une co-sélection de la résistance aux fluoroquinolones par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutique humaine.

Ces mécanismes plasmidiques de résistance aux quinolones confèrent indépendamment un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones, mais leur présence pourrait en outre favoriser l'évolution vers un plus haut niveau de résistance par la sélection de mutation dans les cibles de ces molécules.

La caractérisation moléculaire des transconjugants issus de la souche S14 et S17 et l'étude de leurs profil plasmidique montrent que les gènes CTXM 28, qnr B1 et aac (6) Ib-cr sont portés par des plasmides conjugatifs.

L'émergence de cette combinaison de gènes de résistance en Algérie pourrait poser un problème de santé publique et impose de mettre en place une politique pertinente de surveillance de la résistance en vue d'un meilleur contrôle de la circulation des souches multirésistantes.

Les taux de résistance aux quinolone enregistré (à Annaba et ceux enregistré à l'échelle nationale) indique que les quinolones gardent toujours leurs efficacités, mais le fait que cette résistance soit presque toujours associée à une résistance aux β lactamine et /ou aux aminosides (souches multirésistantes) et en plus le caractère transférable de cette résistance; nous mène à conclure qu'il faut être plus attentifs dans l'utilisation thérapeutique de ces molécules : Ainsi, on préconise de ne jamais prescrire les quinolones en monothérapie et en première intention ce qui présente un grand risque de sélection des souches multirésistantes, et leurs utilisations en seconde intention doit être prescrit seulement après un test de sensibilité aux antibiotiques et toujours en association.

Références bibliographiques :

Aarestrup F., Wegener H. et Collignon P., 2008.

Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies.
Expert Review of Anti-Infective Therapy. **6**:733-750

Ambrozic Avgustin J., Keber R., Zerjavic K., Orazem T. et Grabnar M., 2007

Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac (60)-Ib-cr in extended-spectrum β lactamase-producing klebsiella isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005.
Antimicrob. Agents Chemother. **51**: 4171–4173.

Bahl M. I., Sorensen S.J., Hansen L.H. et Licht T.R., 2004.

Effect of tetracycline on transfer and establishment of the tetracycline-inducible conjugative transposon Tn916 in the guts of gnotobiotic rats.
Appl. Environ. Microbiol. **70**:758-764.

Ball P., 2000.

Quinolone generations: natural history or natural selection?
J. Antimicrob. Chemother. **46** (Suppl T1): 17 - 24.

Barry A.L., Fuchs P.C., Brown S.D., 2001

In vitro activities of three nonfluorinated quinolones against representative bacterial isolates.
Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 1923-1927

Belloc C., Lam D.N., Pellerin J.L., Beaudreau F. et Laval A., 2005.

Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora.
J. Appl. Microbiol. **99**: 954-959.

Ben Achour N., Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben Moussa M., Galleni M., et al., 2009

First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain.
Pathol. Biol. (Paris). **57**: 343–348.

Blondeau J.M., 1999

A review of the comparative in vitro activities of 12 antimicrobial agents, with focus on five new respiratory quinolones.,
Antimicrob. Agents Chemother. **43** (supp B) : 1-11.

Bogard M. et Lamoril J. 1998

Biologie Moléculaire en biologie clinique. I. Méthodes.
Collection Option Bio. Ed, Elsevier. p.309

Borcherding S.M., Stevens R., Nicholas R.A., 1996

Quinolones: a practical review of clinical uses, dosing considerations and drug interaction.
The journal of family practice. **42** : 69 - 78

Bryskier A. 1995

Bases de la classification et relation structure activité des antibiotiques In : Bergogne Bérézin E, Dellamonica Ped. Antibiothérapie en pratique clinique.
Ed : Masson. Paris : pp. 66-104

Burrus, V., Pavlovic G., Decaris B. et Guedon G., 2002.

Conjugative transposons: the tip of the iceberg.
Mol. Microbiol. **46**: 601-610.

Bush K., Jacoby G.A. et Medeiros A.A., 1995.

A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.
Antimicrob.Agents Chemother. 39:1211-1233.

Camille A., 2007

Présence d'un gène de résistance plasmidique aux quinolones dans l'environnement aquatique
Ed : Masson. Paris. p.168.

Canton R. et Coque T.M., 2006

The CTX-M beta-lactamase pandemic.
Curr. Opin .Microbiol. **9**(5): 466 –75.

Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M., 2009

Qnr D, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin.
Antimicrob. Agents Chemother. **53**: 603–608.

Chalus-Dancla E., Cloeckert A., Payot S. et Baucheron S., 2002.

Les multiples façons de faire de la résistance aux antibiotiques. In C. Legrand (ed.), Antibiothérapie bovine Acquis et consensus. Le Point Vétérinaire, Maisons-Alfort. p. 53-67

Chen C. R., Malik M., Synder M. et Drilica K., 1996

DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone –induced DNA cleavage.
J.Mol.Biol. **258** : 627 – 637.

Chopra I., O'Neill A. et Miller K., 2003

The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria.
Drug Resist. Updates . **6**:137-145.

Christianne P. 2000

Maladies infectieuses; Ed: doin-Paris . pp. 103-107

Churchward G. 2002.

Conjugative transposons and related mobile elements.
American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 177- 191.

Claude M. & Gouin F., 1994

Antibiothérapie en réanimation et chirurgie. Ed. Arnett, pp. 109 – 132

Clewell, D. B., 1993.

Bacterial conjugation.
Plenum Press, New York. Don edition; p. 430

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA.

Communiqué d'O M S (organisation mondiale de la santé), 2008

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en ALGERIE, 9ème Rapport d'évaluation, pp. 22-25.

Communiqué d'O.M.S., 2003

Standardisation de l'antibiogramme en Médecine humaine à l'échelle national selon les recommandations de l'O.M.S., 3ème édition I.N.S.P., Algérie.pp. 11-13.

Communiqué d'O.M.S., 1998

Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques
Communiqué OMS n° 46, 9 juin 1998, pp. 46-53.

Craig W., Dahloff A., 1998

Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals.
Handbook Expt. Pharmacol. **127**: 206 -232.

Davies J., 1997.

Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants .
Review .Ciba. Found. Symp. **207**:15-27; discussion 27-35.

Davison J., 1999.

Genetic exchange between bacteria in the environment.
Plasmid. **42**:73- 91

Davis R., Markham A. et Balfour J.A., 1996.

Ciprofloxacin. An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability.
Drugs . **51**:1019-1074.

Daugelavicius R., Bakiene E. et Bamford D.H., 2000.

Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope.
Antimicrob. Agents Chemother. **44** : 2969 - 2978.

Dorosz PH., 2006

Guide pratique des médicaments.
Academie nationale de médecine.Ed Maloine (26 ème). pp.180-185

Drilica K. et Zhao X ., 1997

DNA- gyrase, topoisomérase and the 4-quinolones.
Microbiology and Molecular Biology Reviews. 377-392.

Dubnau D., 1999.

DNA uptake in bacteria.

Annu. Rev. Microbiol. **53**:217-244.

Dutta C. et Pan A., 2002.

Horizontal gene transfer and bacterial diversity.
J. Biosci. **27**:27-33.

Espie E., De Valk H., Vaillant V., Quelquejeu N., Lequerrec F. et Weill F., 2004

An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections linked to the consumption of imported horse meat in France
Epidemiol. Infect. **133**:373-376.

Everett M.J., Piddock L.J.V., 1998

Mechanism of resistance to fluoroquinolones .
Handbook Expt. Pharmacol; Ed Springer-verlag. pp. 259 – 296

Fihman V., Lartigue M.F., Jacquier H., 2008

Appearance of aac (60) –Ib -cr gene among extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital.
J. Infect. **56** : 454 – 459.

Firsov A. A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y., Drlica K., Portnoy Y.A. et Zinner S.H., 2003.

In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*.
Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1604-1613

Friedman S. M., Lu T., Drilica K., 2001

Mutation in the DNA-gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolones resistance determining region.
Antimicrob. Agents Chemother. **45**(8): 2378-2380.

George A., Kelley E., Walsh C., Debra M., Victoria J., Herin O.H., Robicsek A. et Hooper D.C., 2006

qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **50** (4) : 1178-1182,

George A., Nancy C. et Waites K.B., 2003

Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **47**(2): 559-562

Goa K.L., Bryson H.M. et Markham A., 1997

Ciprofloxacin an updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. Drugs. **53** (4): 51 – 74

Grange J. D., Roulot D., Pelletier G., Pariente E.A., Denis O., Blanc P., Richardet J.P., Vinel J.P., Delisle F., Fischer D., Flahault A. et Amiot X., 1998.

Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial.
J. Hepatol. **29**:430-436.

Grindley N. D. G., 2002.

The movement of Tn3-like elements: Transposition and cointegrate resolution
American Society for Microbiology. Washington, D. pp. 272-302.

Gu Y., Zhang J., Yu Y., Zhou Z., Du X., 2004

Drug-resistant mechanisms and prevalence of *Enterobacter cloacae* resistant to multi-antibiotics.
Chin .J. Nosocomiol.**14**:1321 – 1324.

Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou-Ndouba A., 2008

Qnr-Type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Cost.
Pathol Biol (Paris) . **56** : 439–446.

Guiney D. G., 1993

Broad host range conjugative and mobilizable plasmids in Gram negative bacteria,
ed , Clewell , New York. pp. 75-103.

Hancock R. E., 1997

Peptide antibiotics.
Lancet. **349** : 418 - 422.

Haniford D. B., 2002

Transposon Tn10. In N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, and A. M. Lambowitz (ed.), Mobile DNA II. American Society for Microbiology, Washington, D. C, A.S.M. Press. pp. 457-483

Honore´ S., Lascols C., Malin D., Argaouchi R. et Cattoir V., 2006

Investigation of the new QNR-based Mechanism of quinolone resistance among enterobacterial strains isolated in Henri - Mondor hospital 2002–2005.
Pathol. Biol .(Paris) . **54**: 270–9.

Hooper D. C., 2001.

Mechanism of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones.
Clinical Infectious Diseases . **32** : 9 – 15.

Hooper D.C. 1999

Mechanism of action and resistance.
Drug Resist. Updat . **2** : 38 –55.

Hooper D.C., Wolfson J.S., 1993

Mechanism of quinolone action and bacterial killing,
Quinolone Antimicrobial Agents, ed 2. Washington DC, American Society for Microbiology. pp. 53 – 75.

Hoshino K., Kitamura A., Monissey I., Sato K., Kato J et Ikeda H., 1994.

Comparaison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition .
Antimicrobial Agents and Chemotherapy . **38** (11) : 2623- 2627.

Ippen-Ihler K. et Skurray R.A., 1993.

Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids, p. 23-52. In D. B. Clewell (ed.), Bacterial conjugation. Plenum Press, New York.

Kado C.I., Liu S.T., 1981

Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.
J. Bacteriol. **45**:1365 – 1373.

Khodursky A. B., Zechiedrich E.L. et Cozzarelli N. R., 1995

Topoisomerase IV is a target of quinolone in *Escherichia coli*
Proc.Natl.Acad.Sci.USA . **92**: 1101 – 1180.

Labadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdan-Bouguessa S., Lounes R. et Arlet G., 2008

Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria.
J. Antimicrob. Chemother. **62**:133 –136.

Larouche G., 2001

Les quinolones: des années soixante à aujourd'hui.
Pharmactuel, **34** (2): 40– 46.

Lavilla S., Gonzalez-Lopez G., Miro E., Dominguez E., Llagostera M., Bartolome R., Mirelis B., Navarro F. et PratsG., 2009.

Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson.

J. Antimicrob .Chemother . **61**:1244

Lavilla S, Gonzales-Lopez J., sabate M., Garcia Fernandez A., Larrosa M.N., Bartolome R.M., et al. 2008

Prevalence of qnr genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain.

J. Antimicrob. Chemother. **61**: 291 –295.

Le Minor L., Veron M., 1982

Bactériologie médicale, Ed. Flammarion. p 773.

Li X.Z., 2005

Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms.
Int. J. Antimicrob .Agents . **25**: 453 – 463.

Liassine N., 2000

Problème des pathogènes Gram négatif résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier
Schweiz. Med. Wochenschr. **130**: 19- 30

Lorenz M. G. et Wackernagel W., 1994.

Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.
Microbiol. Rev.**58**: 563 - 602.

Luttinger A., 1995.

The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases.
Mol.Microbiol. **15**: 601 - 606.

Mahillon, J. 1998.

Transposons as gene haulers.
A.P.M.IS. **106** (Suppl.84): 29-36.

Mahrouki S, Chili H, Bourouis M, Barguellil F et Belhadj O, 2011.

First characterization in Tunisia of plasmid mediated Amp C betalactamase DHA-1 co expressed TEM24 and qnr A6 in a multidrug resistant *Proteus mirabilis* clinical strains.

African journal of microbiology research, **5**(23): 3913-3918.

Mami H, Suzuki M., Matsumoto M.,Takahashi M., Sato K., Ibe S. et Sakae K., 2005
Cloning of a Novel Gene for Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid in *Shigella flexneri* 2b
Antimicrob. Agents Chemother. **49** : 801 - 803.

Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P., 2005
Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe.
Antimicrob. Agents Chemother. **49**:71 –76.

Martinez-Martinez L., Pascual A. et Jacoby G.A., 1998
Quinolone resistance from a transferable plasmid.
Lancet . **351** : 797–799

Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, et al. 2008
Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria).
Pathol. Biol. (Paris) . **56**: 319 –325.

Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski Y. et Tulkens P.M , 1999.
Aminoglycosides: activity and resistance.
Antimicrob. Agents Chemother. **43**:727-737.

Mouton Y., Bingen Y., Debesker Y. et Oubreuil L., 2000.
Antibiotiques ; antiviraux –anti infectieux.
Edition John Libbey Eurotext . pp. 145- 153

Nazic H., 2005
Further Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant in Enterobacteriaceae in Turkey
Antimicrob. Agents Chemother. **49**(5): 2146-2147

Nordmann P et Poirel L., 2005
Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae
Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **56** (3): 463 - 469

Osborn A. M. et Boltner D., 2002.
When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum.
Plasmid. **48** : 202-212.

Owens R.C. et Ambrose P.G., 2000
Clinical use of the fluoroquinolones.
Med. Clin .North .Am. **84**(6):1447-1469.

Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D. et Hooper DC., 2006
Prevalence in the United States of aac (60)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme.
Antimicrob. Agents. Chemother. **50** : 3953 –3955.

Paterson D. L. et Bonomo R.A., 2005
Extended-spectrum β -lactamases: aclinical update.

Clin. Microbiol. Rev. **18**:657-686.

Paulsen I. T., Brown M.H. et Skurray R.A., 1996

Proton-dependent multidrug efflux systems.
Microbiol. Rev. **60** : 575 - 608.

Pembroke J. T., MacMahon C. et McGrath B., 2002

The role of conjugative transposons in the enterobacteriaceae.
Cell. Mol. Life Sci. **59** : 2055-2064.

Perichon B., Courvalin P. et Galimand M., 2007

Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S Rrna and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. **51**: 2464 – 2469.

Perichon, B., Reynolds P., and Courvalin P., 1997

VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339.
Antimicrob. Agents Chemother. **41**: 2016 - 2018.

Philippon A., Arlet G. et Jacoby G.A., 2002

Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases.
Antimicrob. Agents Chemother. **46**(1):1-11.

Poirel L., Leviandier C. et Nordmann P., 2006

Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants Qnr A and Qnr S in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital.
Antimicrob. Agents Chemother. **50**: 3992 –3997.

Poole K., 2004

Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.
Clin. Microbiol. Infect. **10**: 12 - 26.

Pultz M. J., Nerandzic M.M., Stiefel U. et Donskey C.J., 2008.

Emergence and acquisition of fluoroquinolone-resistant gram-negative bacilli in the intestinal tracts of mice treated with fluoroquinolone antimicrobial agents.
Antimicrob. Agents Chemother. **52**:3457-3460.

Putman M., van Veenh W. et Konings W.N., 2000.

Molecular properties of bacterial multidrug transporters.
Microbiol. Mol. Biol. Rev.; **64** : 672 - 693.

Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C., 2006

The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance.
Lancet. Infect. Dis. **6** : 629 –640.

Rodriguez-Martinez J. M., Velasco C., Garcia I., Cano M.E., Martinez- Martinez L. et Pascua L., 2007

Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant qnrA1.
Antimicrob. Agents Chemother. **51**: 2236-2239.

Rodriguez-Martinez J.M., Poirel L., Pascual A. et Nordman P., 2006

Plasmid mediated quinolone resistance in Australia.

Microb. Drug Resist. **12** (2): 99 – 102.

Roh K.H., Uh Y., Kim J.S., Kim H.S., Shin D.H. et Song W., 2008

First outbreak of multidrug- resistant *klebsiella pneumoniae* producing both SHV -12-type extended-spectrum beta-lactamase and DHA-1-Type AmpC beta-lactamase at a Korean Hospital Yonsei.

Med .J. **49** (1): 53 –57.

Rowe-Magnus D. A., Guerout A. M., Ploncard P. et Mazel D., 2001.

The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**: 652 - 657.

Rowe-Magnus D. A. et Mazel D., 2001.

Integrans: natural tools for bacterial genome evolution.

Curr .Opin .Microbiol. **4**: 565-569.

Sahm D.F., Critchley I.A., Kelly L.J., Karlowsky J.A., Mayfield D.C.,Thornsberry C., Mauriz Y.R. et Kahn J., 2001

Evaluation of current activities of fluoroquinolones against gram-negative bacilli using centralized in vitro testing and electronic surveillance.

Antimicrob. Agents Chemother. **45** : 267 – 274.

Shaw K. J., Rather P.N., Hare R.S. et Miller G.H., 1993.

Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.

Microbiol. Rev. **57**: 138-163.

Schwarz S. et Chaslus-Dancla E., 2001.

Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance.

Vet. Res. **32** : 201 - 225.

Stokes H. W. et Hall R.M., 1989.

A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrans.

Mol. Microbiol. **3**: 1669 - 1683.

Tagu D. et Moussard C., 2003

Principes des techniques de biologie moléculaire

2^{ème} édition, INRA. p. 102.

Thierry E., 1998

Les antibiotiques : classification, mode d'action, utilisation thérapeutique

Edition NATHAN UNIVERSITE . 128 p.

Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Madoux J., Gharout A. et de Champs C., 2008

Enterobacter cloacae and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria.

J. Hosp. Infect. **68**: 183 –185.

Towner K.J., 1995

Mechanisms of acquired resistance. In: Greenwood D., editor. Antimicrobial chemotherapy. 3rd ed. Oxford University Press . pp.147-158 .

Walsh C., 2003.

Antibiotics: actions, origins, resistance.
American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., et al. 2009

New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *proteus mirabilis*.
Antimicrob. Agents. Chemother. **53** : 1892 - 1897

Wang M., Tran J.H., Jacoby G.A., Zhang Y., Wang F., Hooper D.C., 2003

Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China.
Antimicrob. Agents .Chemother. **47**: 2242 –2248.

Weill F. X., Lailier R., Praud K., Kerouanton A., Fabre L., Brisabois A., Grimont P.A et Cloeckaert A., 2004

Emergence of extended-spectrum- β -lactamase(CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France.
J. Clin. Microbiol. **42**:5767-5777

Wepierre J., 1981

Abrégé de pharmacologie générale et moléculaire.
Ed Masson. Paris. 191 p.

Wiuiff C., Lykkesfeldt J., Svendsen O. et Aarestrup F.M., 2003.

The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs.
Res.Vet. Sci. **75**:185-193

Yamagishi j., Yoshida H., Yamayoshi M. et Nakamura S., 1986

Nalidixic acid – resistant mutation of the gyr B gen of *E. coli*.
Mol.Gen.Genet. **204** : 367 – 373.

Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K. et Shibata N., 2007

New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, Qep A, found in an *Escherichia coli* clinical isolate.
Antimicrob. Agents .Chemother. **51**: 3354–3360.

Yoshida H. Bogaki T. et Nakamura M., 1990

Quinolones resistance determing region in the DNA gyrase gyr A gene of *Escherichia coli*.
Antimicrob..Agent.Chemother. **34**: 1271-1272.

Yoshida H., Kojima T., Yamagishi J. et Nakamura S., 1988

Quinolones resistance mutation of the gyr A gene of *Escherichia coli*
Mol.Gen.Genet. **211** : 1- 7.

Zhao S., Qaiyumi S., Friedman S., Singh R., Foley S., White D., McDermott P., Donkar T., Bolin C. et Munro S., 2003.

Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals.
J. Clin. Microbiol. **41**: 5366-5371

Zhao S., White D.G., McDermott P.F., Friedman S., English L., Ayers S., Meng J., Maurer J.J., Holland R. et Walker R.D., 2001

. Identification and expression of cephamycinase *bla*_{CMY} genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat.

Antimicrob. Agents. Chemothe. **45**:3647-3650.

Zhang L., Dhillon P., Yan H., Farmer S. et Hancock R.E., 2000.

Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 3317-3321.

