

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
EN MICROBIOLOGIE
Option: Microbiologie Appliquée

THEME

**Caractérisation des souches de *Escherichia coli*
résistantes aux antibiotiques isolées au centre
hospitalier universitaire d'Annaba.**

Présentée par **SASSI Asma**

Devant le JURY

Présidente de jury :	Pr. Nafissa ABBACI	Université d'Annaba
Directrice de thèse:	Pr. Houria CHETTIBI	Université d'Annaba
Co-directeur :	Pr. Mazouz DEKHIL	Faculté de Médecine Annaba
Examineur :	MCA. Tarek MERAD	Université d'Annaba
Examinatrice :	MCA. Nadjoud GRARA	Université de Guelma

Année universitaire: 2015-2016

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu remercier mon dieu **Allah** qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

J'exprime ensuite mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, **Professeur Houria CHETTIBI**, pour m'avoir encadrée, conseillée et encouragée tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon co- directeur de thèse, **le Professeur Mazouz DEKHIL**, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Microbiologie du CHU Dr Dorban- Annaba, où j'ai pu réaliser la première partie de mon travail. Merci de m'avoir fait confiance et m'a encouragé pour la réalisation de ce projet de recherche. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

Je tiens aussi à remercier vivement le **Professeur Jean-Marc ROLAIN** de m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse dans son laboratoire de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'université « Aix-Marseille-France », et m'avoir immédiatement accordé sa confiance. Je vous remercie pour vos précieux conseils et pour tout ce que vous m'avez appris avec toute votre équipe de recherche.

C'est avec un grand plaisir que je remercie également :

Mme. Nafissa ABBACI, professeur à l'université d'Annaba, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse, que ce travail constitue le témoignage de notre respect.

Mr. Tarek MERAD, Maître de conférences de classe A à l'université d'Annaba, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Mlle. Nedjoud GRARA, Maître de conférences de classe A à l'Université de Guelma, qui m'a fait l'honneur d'analyser ce travail, nous vous sommes particulièrement reconnaissants d'avoir accepté de vous déplacer à Annaba.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner:

Le **Docteur LOUCIF Lotfi**, Maitre de conférences de classe B à l'Université de Batna, pour ses fructueuses discussions, ses conseils avisés, son oreille attentive et son dynamisme. Je remercie chaleureusement, Mme Bendjama Esma, et sa sœur Salma, pour leur aide, leur soutien, leur gentillesse, et leur amitié. Travailler avec vous a été un grand plaisir ! Je vous remercie du fond du cœur.

Tous les membres de l'équipe de recherche de l'URMITE de Marseille, pour leur accueil et sympathie, spécialement **Valérie FILOSA**.

Tout le personnel du laboratoire de recherche du département de biochimie de l'université d'Annaba.

Tout le personnel du laboratoire CHU Dr Dorban Annaba, pour leurs conseils, aide et disponibilité.

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier particulièrement mes très chers parents. Je leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral et financier ainsi que pour leurs encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur.

Mes remerciements s'adressent aussi à mon très cher frère pour son aide et son encouragement.

A toute ma famille et a mes amies qui, de près comme de loin, m'ont encouragé aux moments opportuns.

J'exprime également toute ma reconnaissance à mon mari pour sa patience, sa compréhension, ces sacrifices consentis tout au long de ce travail, et pour son soutien sans faille. Je ne te remercierais jamais assez..., le plus beau reste à venir !

Enfin, merci à mon fils, mon petit rayon de soleil qui illumine mes jours, et qui donne un sens à ma vie. **Mohammed**, cette thèse t'est dédiée!

Merci à tous.....

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
Partie I : Etude bibliographique.....	4
Chapitre 1. Etude de l'espèce <i>Escherichia coli</i>.....	5
1- Historique	5
2- Taxonomie.....	5
3- Habitat.....	6
4- Caractères bactériologiques.....	6
4.1- Morphologie.....	6
4.2- Caractères culturels.....	7
4.3- Caractères biochimiques.....	7
4.4- Caractères antigéniques.....	8
4.4.1- Les antigènes somatiques « O ».....	9
4.4.2- Les antigènes flagellaires « H ».....	9
4.4.3- Les antigènes de surface « K ».....	10
5- Facteurs de pathogénicité.....	11
6- Pathogénie.....	11
6.1- Infection du tractus urinaire (ITU).....	12
6.2- Septicémie/bactériémie.....	13
6.3- Méningites.....	13
6.4- Syndromes diarrhéiques.....	13
6.4.1- Souches Entero toxinogènes ETEC (<i>Enterotoxinogen Escherichia coli</i>).....	14
6.4.2- Souches Entero-invasives : EIEC (<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>).....	14
6.4.3- Souches Entero hémorragiques dites EHEC.....	14
6.4.4- Souches Enteropathogènes : EPEC (<i>Enteropathogen Escherichia coli</i>).....	15
6.4.5- Souches Entéro-Aggrégative (ECEAgg).....	15
6.4.6- <i>Escherichia coli</i> adhésion diffuse ECAD (<i>Diffuse Adhesing E. coli</i>).....	15
7- Epidémiologie.....	16

Chapitre 2. Résistance de <i>E. coli</i> aux antibiotiques.....	17
1- Les antibiotiques.....	17
1.1- Définition.....	17
1.2- Mode d'action des antibiotiques.....	17
1.2.1- Mode d'action des β -lactamines	18
1.2.2- Mode d'action des aminosides.....	19
1.2.3- Mode d'action des quinolones.....	19
2- Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	19
2.1- Types de résistance.....	20
2.1.1- Résistance naturelle.....	20
2.1.2- Résistance acquise.....	20
3- Supports génétiques de la résistance.....	21
3.1- Le chromosome.....	21
3.2- Les éléments génétiques mobiles.....	21
3.2.1- Les plasmides.....	22
3.2.2- Séquences d'insertion et transposons.....	22
3.2.3- Les intégrons.....	23
4- Mécanismes de la résistance.....	23
4.1- Le cas des β -lactamines.....	24
4.1.1- Mécanismes de résistance aux β -lactamines non enzymatiques.....	24
4.1.1.1- Diminution de la perméabilité.....	24
4.1.1.2- Hyperproduction de système d'efflux	24
4.1.1.3- Modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP).....	25
4.1.2- Mécanismes de résistance aux β -lactamines enzymatiques.....	25
4.1.2.1- Production des β -lactamases.....	25
4.1.2.2- Production des céphalosporinases plasmidiques	29
4.1.2.3- Production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	30
4.1.2.3.1- Différents types de BLSE	31
4.1.2.3.2- Epidémiologie des BLSE.....	33
4.1.2.4- Production des Carbapénèmases.....	34
4.1.2.4.1- Épidémiologie mondiale des Carbapénèmases.....	34

Partie II : Matériel et Méthodes.....	39
1- Objectifs de l'étude.....	40
2- Souches bactériennes	41
3- Ensemencement et incubation.....	41
4- Isolement et purification	41
5- Conservation des souches	41
6- Identification de souches.....	41
6.1- API 20E (BioMérieux, Meylan, France).....	42
6.2- La spectrométrie de masse MALDI-TOF(Microflex).....	43
7- Antibiogramme selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM/EUCAST)	46
8-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test.....	48
9- Recherche phénotypique de la production des BLSE	49
9.1- Test de synergie.....	50
9-2- Test du double disque : (appelé aussi test espagnol).....	51
9.3- Test à la cloxacilline.....	52
10- Recherche phénotypique des carbapénèmases.....	52
10.1- Test de Hodge	53
10.2- Test de synergie EDTA-IMP : Détection des metallo- β -lactamases (M β L)	53
11- Test d'imipénèmase par MALDI TOF ultraflex	54
12-Recherche moléculaire des β -lactamases	56
12.1. Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et des carbapénèmases	57
12.1.1- Polymerase Chain Réaction (PCR) en temps réel	57
12.1.2- Polymérase Chain Réaction(PCR) standard	62
12.1.2.1- Electrophorèse sur gel d'agarose	65
12.1.2.2- Séquençage	66
12.1.2.3- Analyse des séquences ADN	69
13- Recherche moléculaire de la résistance associée (aminoside, quinolone)	69
14- Transfert des plasmides par conjugaison	70
14.1- Extraction de l'ADN plasmidique.....	72
15- Typage moléculaire des souches : <i>Multi-locus sequence typing</i> (MLST).....	75

Partie III : Résultats et discussion	77
Résultats	78
1-Identification et origine des souches de <i>E.coli</i> isolées.....	78
1.1- Répartition des souches de <i>E.coli</i> selon la nature du produit pathologique.....	82
1.2-Répartition des patients infectés par l'espèce <i>E.coli</i> selon le sexe.....	82
1.3-Répartition des patients infectés par l'espèce <i>E.coli</i> selon l'âge.....	83
1.4- Répartition des souches selon les services d'hospitalisation.....	84
2- Profil de résistance aux antibiotiques.....	84
2.1- Résistance aux β -lactamines des souches de <i>E.coli</i>	84
2.2- Résistance aux aminosides.....	85
2.3- Résistance aux quinolones.....	86
2.4- Résistance aux autres antibiotiques.....	87
3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test.....	89
4- Recherche phénotypique de la production des BLSE.....	90
4.1- Test de synergie	90
4.2- Double disque.....	91
4.3- Test de synergie sur gélose Mueller-Hinton additionné de cloxacilline.....	91
5- Recherche phénotypique des carbapénèmases.....	92
5.1- Test de Hodge.....	92
5.2-Test à l'EDTA.....	94
5.3-Test MALDI TOF ultraflex.....	97
6- Déduction des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	98
7- Détermination des supports génétiques de la résistance.....	99
7.1- Détection moléculaire des gènes codant pour les BLSE.....	99
7.1-1- Par PCR en temps réel.....	99
7.1-2- Par PCR standard.....	102
7.2- Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénèmases.....	105
7.3- Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés.....	108
7.4-Arbres phylogénétiques.....	112
8- Détection moléculaire des gènes de la résistance croisée.....	115
8.1-Résistance aux aminosides.....	115
8.2-Résistance aux quinolones.....	116
9- Conjugaison bactérienne.....	116
9.1- Analyse du profil plasmidique.....	117
10-Génotypage par <i>Multi-locus sequence typing</i> MLST.....	124
Discussion	128
Partie IV : Conclusion et perspectives	144
Conclusion	145
Perspectives	146
Références bibliographiques	148
Résumés	186
Annexes	193

Liste des abréviations

°C : Le degré Celsius

µl : Microlitre

16 S : Svedberg (vitesse de sédimentation)

30 S : Ribosome bactérien

A : Adénine (base azotée)

AAC : Aminoglycoside acetyltransferases

AAD: Aminoglycoside adenyltransferase

AARN : Réseau National de Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

ACT : Gène codant pour une céphalosporinase

ADH : Arginine dihydrolase

Adk : Adenylate kinase

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AME: Aminoglycosides modifying enzymes

AmpC: Bêta-lactamase chromosomique

ANT: Nucléotidyltransférase

APH: Phosphotransférase

API 20E: Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

ARA : Arabinose

Arm: Aminoglycoside resistance methylase

ARN: Acide ribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP: Adénosine Triphosphate

Azide R : Résistant à l'azide

BET: Bromure d'éthidium

BGN : Bactérie à Gram négatif

BLAST N : Basic Local Alignment tool Nucléotide

BLAST P : Basic Local Alignment tool Protéine

BLAST : Basic Local Alignment tool

BLSE: β-lactamase à spectre étendu

BMR : Bactérie multi-résistante

C : Cytosine (base azotée)

C+G%: Pourcentage en guanine + cytosine du génome

C1G : Céphalosporine de première génération

C2G: Céphalosporine de deuxième génération

C3G: Céphalosporine de troisième génération

C4G: Céphalosporine de quatrième génération

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie

CC : Complexe clonal

CHN : Céphalosporinase haut niveau

CHU : Centre hospitalier universitaire

CIT : Citrate

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CMY : Cephamycinase (gène codant pour une céphalosporinase plasmidique)

CTX-M : Cefotaxime Munich

D: Souche donatrice

ddntp : Acides nucléiques modifiée

DHA : Gène codant pour une céphalosporinase

DOS : 2-désoxys- treptamine

EAgEC : *E.coli* enteroagregative

EARS-net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

ECP: Electrophorèse en champ pulsé

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique

EHEC : *E. coli* entérohémorragique

EIEC : *E. coli* entéroinvasifs

EMB: Eosine bleu de méthylène

EPEC : *E. coli* entéropathogènes

ERIC-PCR : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polymerase chain reaction

ESBL: Extended spectrum beta-lactamase

ETEC : *E. coli* entérotoxinogéniques

EUCAST: The European comity on antibiotic susceptibility testing

ExPEC : « *Extraintestinal pathogenic E. coli* »

F: Forward

FOX : Gène codant pour une céphalosporinase

FumC : Fumarate hydratase

G : Guanine (base azotée)

GEL : Gelatinase

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

GLU : Glucose

gyrB : Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H2O UP : Eau Ultra-Pure

H2S : Hydrogen Sulfide

HCCA: Acide- α -cyano-4-hydroxycinnamique

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

I : Intermediatire

IBC : Integron Borne Cephalosporinase

Icd : Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase

ICE : Intégrative and Conjugative Element (élément d'intégration et de conjugaison)

IMP : Imipéménase (carbapénémase)

IMP^R : Résistante à l'imipénème

Inc L/M: Groupe d'incompatibilité du plasmide

IND : Indole

INO : Inositol

K: antigène capsulaire

Kb : Kilo bases

L : Litre

LART : L'Antibio-Résistance en Tunisie

LB : Lauria Bertani

LCR: Liquide céphalorachidien

LDC: Lysine décarboxylase

LEN : Bêta-lactamse chromosomique

LPS: Lipopolysaccharide

M: Marqueur

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MAN : Mannitol

MBL : Métallo- β -lactamase

Mdh : Malate dehydrogenase

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MEL : Melibiose

mg Milligramme

MH: Mueller Hinton

MIC: Minimum inhibitory concentration

min : Minute

ml : Millilitre

MLST: Multi-locus sequence type

MS: Microflex

NCBI: Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

NHSN: National Healthcare Safety Network

npm: ARNr 16S méthyltransférase

O: Antigène somatique

ODH : Ornithine Decarboxylase

OKP : Bêta-lactamase chromosomique

ONPG : L'orthonitrophényl- β -galactoside

ORL : Oto-rhino-laryngologie

OXA: Oxacillinase (carbapénémase)

Pb : Paires de bases

PBN : Pénicillinase bas niveau

PCR: Polymerase chain reaction

PER: *Pseudomonas* extended resistance (une bêta-lactamase à spectre étendu)

PFGE: Pulsed Field Electrophoresis Gel

PHN: Pénicillinase de haut niveau

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

PRI : Pénicillinase résistant aux inhibiteurs

PSM: Poste de Sécurité Microbiologique

purA : Adenylosuccinate dehydrogenase

qnr : Quinolone resistance gene

QRDR : Quinolone Resistance Determining Region

R : Reverse (inverse)

RADP : Random Amplification of Polymorphic DNA

recA : ATP/GTP binding motif

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RHA : Rhamnose

RM: Réaction au rouge de Methylene

Rmt: ARNr 16S méthyltransférase

RNA: Ribonucleic acid

RPM : Rotation par minute

rpoB : Bêta-subunit of RNA polymerase

S : Seconde

SAC : Saccharose

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SFO : *Serratia fonticola* (une bêtalactamase à spectre étendu)

SHV: Sulfhydryl variable

SMART : Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends

SOR : Sorbitol

spp : Species (espèces)

ST: Sequence type

SXT : Sulfamides + Triméthoprim

TBE : Tris-Borate-EDTA

TC: Transconjugant

TDA : Tryptophan Deaminase

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

TFA : Acide trifluoroacétique

TLA : Tlahuicas, tribu mexicaine (une bêtalactamase à spectre étendu)

TRI : TEM résistant aux inhibiteurs

TSAR : La surveillance de la résistance aux antibiotiques Taïwanaise

TSB : Trypto-caséine soja

tuf : Gène d'élongation du facteur TU

U : Uracile (base azotée)

UV : Ultra-violet

V : Volt

VEB : Vietnam extended spectrum (une bêtalactamase à spectre étendu)

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIM: Verona Imipéménase (carbapénémase)

VP : Réaction de Voges-Proskauer

Zn⁺² : Zinc

Liste des figures

Figure 1. Sites de colonisation des <i>E.coli</i> pathogènes.	12
Figure 2. Cibles des principaux antibiotiques.	18
Figure 3. Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries.	22
Figure 4. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame.	26
Figure 5. La propagation mondiale de la New Delhi métallo- β -lactamase (NDM-1).	37
Figure 6. Étapes de la spectrométrie de masse.	43
Figure 7. Schéma explicatif du dépôt des disques d'antibiotiques.	50
Figure 8. Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.	51
Figure 9. Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®).	59
Figure 10. Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu sélectif.	72
Figure 11. Répartition des souches par origine de prélèvement.	82
Figure 12. Répartition des patients infectés par l'espèce <i>E.coli</i> selon le sexe	83
Figure 13. Répartition des patients infectés par l'espèce <i>E.coli</i> selon l'âge.	83
Figure 14. Répartition des souches selon les services d'hospitalisation.	84
Figure 15. Résistance aux β -lactamines des 105 souches cliniques de <i>E.coli</i> .	85
Figure 16. Résistance aux aminosides des 105 souches cliniques de <i>E.coli</i> .	86
Figure 17. Résistance aux quinolones des 105 souches cliniques de <i>E.coli</i> .	87
Figure 18. Résistance aux autres antibiotiques testés sur les 105 souches cliniques de <i>E.coli</i> .	88
Figure 19. Antibiogramme de la souche Ec 90.	88
Figure 20. CMI par E-test des 3 souches de <i>E.coli</i> résistantes à l'imipénème.	89
Figure 21. Concentrations minimales inhibitrices par E-test de la souche Ec 37 résistante à l'imipénème.	90
Figure 22. Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche Ec1.	91
Figure 23. Ec 65 productrice de BLSE (Double disque positif).	91
Figure 24. La souche Ec 79 productrice d'une BLSE plus céphalosporinase	92
Figure 25. Test de Hodge des souches Ec 40 et Ec 70	93
Figure 26. Test de Hodge de la souche Ec 37	94
Figure 27. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 40 productrice d'une métallo-carbapénémase.	95
Figure 28. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 70 productrice d'une métallo-carbapénémase.	96
Figure 29. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 37 productrice d'une métallo-carbapénémase.	97
Figure 30. Hydrolyse de l'imipénème par Spectres de masse MALDI TOF Ultraflex des 3 souches de <i>E.coli</i> (Ec 37, Ec 40, Ec 70) résistantes à l'imipénème.	98
Figure 31. Amplification du gène <i>bla</i> _{CTX-M} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel.	100
Figure 32. Nombre de cycles de l'amplification du gène <i>bla</i> _{CTX-M} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel.	101
Figure 33. Amplification du gène <i>bla</i> _{TEM} et <i>bla</i> _{SHV} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel.	101
Figure 34. Nombre de cycles de l'amplification du gène <i>bla</i> _{TEM} et <i>bla</i> _{SHV} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel	102
Figure 35. Amplification du gène <i>bla</i> _{CTX-M} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR standard.	103

Listes des figures (suite)

Figure 36. Amplification du gène <i>bla</i> _{TEM} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR standard.	103
Figure 37. Amplification du gène <i>bla</i> _{CTX-M} de 10 souches de <i>E.coli</i> par PCR standard.	104
Figure 38. Amplification du gène <i>bla</i> _{TEM} de 10 souches de <i>E.coli</i> par PCR standard.	104
Figure 39. Amplification du gène <i>bla</i> _{SHV} de 10 souches de <i>E.coli</i> par PCR standard.	105
Figure 40. Amplification du gène <i>bla</i> _{NDM} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel.	106
Figure 41. Nombre de cycle de l'amplification du gène <i>bla</i> _{NDM} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR en temps réel.	107
Figure 42. Amplification du gène <i>bla</i> _{NDM} des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR standard.	108
Figure 43. Alignements des nucléotides des gènes <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{NDM-5} et les 3 séquences des souches de <i>E.coli</i> IMP ^R avec le logiciel MEGA 5.	113
Figure 44. Alignements des acides aminés codés par les gènes <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{NDM-5} et les 3 séquences des souches de <i>E.coli</i> IMP ^R avec le logiciel MEGA 5.	114
Figure 45. Arbre phylogénétique du gène <i>bla</i> _{NDM}	115
Figure 46. Amplification du gène Aad Gr1 des 3 souches de <i>E.coli</i> IMP ^R par PCR standard.	116
Figure 47. Culture du transconjugant sur le milieu selectif de Lauria Bertani (LB) additionné de 100µg/ml azide, 2µg/ml imipénème.	118
Figure 48. Identification par MALDI-TOF-MS des 3 souches de <i>E.coli</i> transconjugants.	119
Figure 49. Profil de résistance des souches donatrices (<i>E.coli</i> NDM-5) et les transconjugants (<i>E.coli</i> J53-NDM-5).	120
Figure 50. Extraction des plasmides des 3 souches de <i>E.coli</i> donatrices.	122
Figure 51. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène <i>bla</i> _{NDM} des 3 souches <i>E.coli</i> transconjugants (J53-NDM-5).	122
Figure 52. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène <i>bla</i> _{TEM} des 3 souches <i>E.coli</i> transconjugants (J53-NDM-5).	123
Figure 53. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène <i>bla</i> _{CTX-M} des 3 souches <i>E.coli</i> transconjugants (J53-NDM-5).	123
Figure 54. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène <i>aad</i> des 3 souches <i>E.coli</i> transconjugants (J53-NDM-5).	124
Figure 55. Arbre phylogénétique concaténé montrant les relations moléculaires des sept gènes analysés (<i>adk</i> , <i>fumC</i> , <i>icd</i> , <i>purA</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , et <i>mdh</i>) de 33 souches cliniques de <i>E.coli</i> , y compris les trois isolats NDM -5- positifs. Les cercles rouges indiquent les souches de <i>E.coli</i> appartenant à la séquence type 2659.	127

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux caractères biochimiques des bactéries du genre <i>Escherichia</i>	8
Tableau 2. Classification selon Ambler des principales β -lactamases.	27
Tableau 3. Antibiotiques testés.	48
Tableau 4. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR et en temps réel.	60
Tableau 5. Programme de l'amplification de la PCR en temps réel.	60
Tableau 6. Amorces utilisées pour les PCR en temps réel.	61
Tableau 7. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards.	63
Tableau 8. Amorces utilisées pour les PCR standard et le séquençage.	64
Tableau 9. Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.	67
Tableau 10. Programme de l'amplification de la PCR en temps réel.	68
Tableau 11. Caractéristiques des 7 gènes utilisés en MLST.	76
Tableau 12. Provenance des 105 souches de <i>E.coli</i> isolées et leurs scores MALDI TOF- MS	78
Tableau 13. Fréquences des phénotypes de résistance aux β -lactamines des 105 souches de <i>E.coli</i> étudiées.	99
Tableau 14. Profil moléculaire des souches de <i>E.coli</i> isolées.	109
Tableau 15. Profil de résistance des 3 souches donatrices <i>E.coli</i> et les 3 souches de <i>E.coli</i> transconjugants.	121
Tableau 16. Génotypage des 33 souches de <i>E.coli</i> par MLST : Profil des allèles et leurs sequence type (ST).	125

INTRODUCTION

Introduction

À travers l'histoire, les maladies infectieuses ont été la principale cause de mortalité au niveau mondial. De grandes pandémies ainsi que de multiples épidémies locales, répertoriées depuis l'Antiquité, ont entraîné l'effondrement de plusieurs civilisations (**Kardos et Demain, 2013**). Ce n'est qu'au 19^e siècle, qu'une série d'observations ont ciblé la présence de «germe» en tant qu'agent responsable de ces épidémies. Cependant, La corrélation entre la présence de microorganismes et le développement de maladies infectieuses a toutefois été formellement établie en 1869 par les travaux du chimiste et physicien français Louis Pasteur (**Prescott et al., 2010**). Le concept de l'antibiothérapie a été établi par les recherches d'Alexander Fleming (1881-1955) par la découverte de la pénicilline en 1928 (**Fleming, 1929**). Par ailleurs, le succès de l'antibiothérapie a rapidement convaincu de nombreux experts médicaux qu'ils avaient enfin identifié le remède miracle dans le traitement des maladies infectieuses qui affligeaient la population mondiale depuis des milliers d'années. En effet, un sentiment d'optimisme général dans la communauté de l'époque s'est reflété dans la pratique médicale, marqué par une absence de recommandations quant à l'utilisation des antibiotiques. Toutefois, certains scientifiques craignaient les conséquences négatives potentielles qui pouvaient découler de cette utilisation non-contrôlée. En effet, certaines bactéries ont présenté rapidement leur capacité à détruire l'antibiotique par dégradation enzymatique (**Abraham et Chain, 1940**).

Cependant, la résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution. Cette résistance bactérienne est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part. Elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale. La multirésistance aux antibiotiques concerne principalement les bactéries à Gram négatif (**Frasca et al., 2008**). Parmi eux, les souches de *Escherichia coli* constituent les principaux hôtes normaux du tractus gastro-intestinal des humains et de nombreux animaux, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales (atteinte de l'appareil urinaire, du sang et du système nerveux central) (**Johnson et al., 2005**).

Introduction

L'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques et leur propagation à l'hôpital comme en ville sont devenues une préoccupation sanitaire majeure depuis les années 1980 (**Stahl, 2005**). Malheureusement, nous sommes confrontés à la montée croissante de cette résistance, atteignant à l'heure actuelle des niveaux alarmants (**Van Bambeke et al., 2002**).

Depuis plus de 20 ans, la résistance des *E.coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). De nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale de ce type de résistance (**Coque et al., 2008**).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été décrites pour la première fois en 1983 (**Kliebe et al., 1985**), et sont des enzymes plasmidiques, appartenant à la classe A de Ambler, qui confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ière} et 2^{ème} génération et à au moins une céphalosporine de 3/4^{ème} génération (C3/4G) ou à l'aztréonam (**Robin et al., 2012**). La prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (**Perez et al., 2007**).

L'apparition de la résistance chez les *E.coli* est un problème important qui nécessite une attention immédiate. La résistance liée à la production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) est un problème particulier dans le traitement des infections à entérobactéries, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance et menaçant de créer des espèces pan-résistants (**Paterson., 2005**).

Cette tendance à la hausse de la résistance combinée signifie que pour les patients qui sont infectés par ces bactéries multirésistantes aux antibiotiques « BMR » seules quelques options thérapeutiques restent disponibles, parmi ceux-ci, les carbapénèmes, une classe d'antibiotiques de dernier recours bien que plusieurs gènes codant pour les carbapénémases ont été décrits chez l'espèce de *E.coli* (**Nordmann et al., 2010**). Récemment, un nouveau type de carbapénémase plasmidique a été découvert chez une espèce de *E.coli* en 2008, la New Delhi métallo- β -lactamase 1 (NDM-1), chez des patients qui reviennent du sous-continent indien (**Yong et al., 2009**). Ce gène, qui s'est diffusé dans plusieurs types de bactéries à travers le monde, est devenu la préoccupation actuelle des scientifiques car il ne laisse plus d'alternatives thérapeutiques possibles.

Les gènes codant pour ces carbapénémases sont généralement situés sur des plasmides transférables codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, contribuant à un phénotype multirésistant aux antibiotiques (**Rolain et al., 2010**). Ce qui conditionne leur grand pouvoir de dissémination entre différentes souches bactériennes, de même espèce ou

d'espèces différentes, grâce à divers mécanismes de transferts génétiques telle que la conjugaison bactérienne.

Bien que de bonnes politiques d'utilisation des antibiotiques permettent souvent de contrôler les épidémies causées par les bactéries multirésistantes, le problème de la résistance demeure imposant et coûteux pour la société. Il est donc impératif d'étudier le phénomène afin de mieux comprendre l'origine, le fonctionnement et les mécanismes de la résistance aux antibiotiques.

C'est dans cet ordre d'idée que nous nous sommes proposé de réaliser une étude à l'hôpital Dorban d'Annaba selon les étapes suivantes:

- ✓ Mettre en évidence la prévalence et la diversité génétique des souches de *E.coli* « BMR » isolées aux niveaux des hôpitaux de la ville d'Annaba.
- ✓ Identifier le support génétique de cette résistance.
- ✓ Étudier les possibilités de transfert des gènes de résistances et la relation clonale entre les souches.

Pour cela, nous avons eu recours à diverses techniques de Biologie Moléculaire, telles que la PCR, le séquençage, la conjugaison bactérienne ainsi qu'au *multi-locus sequence typing* (MLST).

Ce manuscrit s'articule autour de 4 parties :

La première partie portera principalement sur la revue de la littérature concernant l'étude bactériologique de l'espèce *E.coli*, les différents mécanismes et les données épidémiologiques de sa résistance aux antibiotiques. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une quatrième partie qui sera consacrée à la conclusion et les perspectives de recherche à venir.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Etude de l'espèce *Escherichia coli*

1- Historique

Escherichia coli fut initialement isolé et décrit par le pédiatre allemand Théodore ESCHERICH, en 1885. Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, l'appela *Bacterium coli commune*, ce que l'on peut traduire par «bactérie commune du colon». C'est en 1919 que CASTELLANI et CHALMERS lui donnent son nom définitif en hommage à ESCHERICH. (WHO et al., 1980). A partir des années 1950, de nombreuses souches de *E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (Kaper et al., 2004). Le premier système permettant la reconnaissance et une classification des souches de l'espèce *E.coli* fut la détermination des serotypes, c'est-à-dire une combinaison de certains antigènes de surface (Kauffmann., 1947) ; exemple : O157 :H7 et O111 :H8. Le séro groupe (déterminé par l'antigène « O » exemples O157, O111), reste la méthode la plus utilisée actuellement car le serotype n'est pas suffisant pour caractériser les *E. coli* et chaque serotype n'est pas nécessairement corrélé à la pathogénicité. La bactérie *E.coli* est un véritable pilier de la Biologie. Elle fut au coeur des expériences pionnières des années 1950-1970 qui ont posé les fondements de la génétique bactérienne et de la Biologie moléculaire, et qui ont permis la mise au point des premiers outils de clonage. Depuis *E. coli* est resté un modèle de choix pour disséquer de nombreux processus biologiques essentiels, allant de la recombinaison génétique à la chimiotaxie en passant par la régulation métabolique et la répartition de l'ADN (Ari et al., 2008).

2-Taxonomie

La classification exhaustive de *E.coli* se décline selon :

Règne des Procaryotes

Domaine des Bactéries

Embranchement des protobactéries

Classe des Gamma protéobactéries

Ordre des entérobactéries

Famille des Enterobacteriaceae

Genre *Escherichia*

Espèce *Escherichia coli*.

Soit l'organisme : *Procaryotae*, *Bacteria*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia*, *Escherichia coli* (**Brenner et al., 2005**)

3- Habitat

E.coli est un bacille à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae, hôte commun de la microflore commensale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud tel que les mammifères et les oiseaux. Près de 99% de la flore, que l'on peut évaluer à 10¹⁴ bactéries pour un poids total d'environ 1,5 kg, est cependant constituée d'espèces anaérobies strictes réduisant la part de *E.coli* autour de 0,1% de la masse totale. La colonisation du tractus digestif s'effectue dans les premières heures de la vie à partir de la flore maternelle et *E.coli* constitue par la suite l'espèce bactérienne la plus représentée au sein de la flore aérobie intestinale. Dans le cadre de cette relation commensale *E.coli* est généralement confinée à la lumière intestinale. Cependant, en présence d'un terrain débilité ou immunodéprimé ou lorsque la bactérie est introduite dans d'autres tissus, des souches « non pathogènes » de *E.coli* peuvent être à l'origine de processus infectieux. On notera que bien qu'étant une bactérie commensale, *E.coli* est également capable de survivre dans le milieu extérieur et que d'autre part il existe des souches pathogènes et ou virulentes qui peuvent causer des infections chez l'individu sain (**Russo et Johnson., 2000**).

4- Caractères bactériologiques

4.1- Morphologie

Les *E.coli* sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3µm de long sur 0,6µm de large, mobiles grâce leur ciliature péritriche. Elles sont parfois capsulées. Cependant, il existe des exceptions, certains *E. coli* sont immobiles et agazogène (dénommés *Alkalescens* dispar). *E. coli* possède une paroi constituée de trois couches. De l'extérieur vers l'intérieur, on a une membrane externe, une couche mince de peptidoglycane et un espace périplasmique qui entoure la membrane cytoplasmique. Sur la membrane externe, il y'a la présence de *frimbriae* ou pili communs constituant un facteur d'adhésion pour la bactérie (**Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud, 2002**).

4.2- Caractères culturels

E.coli se développe rapidement *in vitro* sur milieux « ordinaires » et elle est aéro-anaérobie facultatif. Le pH optimum est de 7,5. La température optimale de croissance est 37°C avec un minimum de 20°C et un maximum de 40°C mais la culture est possible entre 20° et 40°C. Le temps d'incubation est entre 18 à 24h. Il donne des colonies *smooth* (S), de 2 à 3mm de diamètre, typique de celle des entérobactéries. La culture sur gélose EMB (Eosine Bleu de Méthylène), donne des colonies à reflet vert métallique, brillant. En milieu liquide la croissance bactérienne induit un trouble uniforme du bouillon **(Vernozy et Montet., 2001)**

4.3- Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques de *E.coli* peuvent être mis en évidence en ensemençant une galerie minimale qui peut être complétée par une galerie API20E. La galerie API20E permet de donner le diagnostic différentiel des autres espèces du genre *Escherichia*. Les principaux caractères biochimiques sont résumés dans le tableau I **(Joly et Reynaud., 2002)**.

Tableau 1. Principaux caractères biochimiques des bactéries du genre *Escherichia* (Joly et Reynaud., 2002).

Caractères biochimiques	<i>E.coli</i>
Mobilité +	+
Gaz en glucose	+
Lactose	+
β- galactosidase	+
Mannitol	+
Saccharose	+/-
RM	+
VP	-
Indole	+
Uréase	-
H ₂ S	-
LDC	+/-
ODH	+/-
ADH	-
TDA	-
CIT	-

RM : rouge de méthyle, **VP** : Réaction de Voges-Proskauer, **LDC** : Lysine décarboxylase, **ODH** : Ornithine décarboxylase, **ADH** : Arginine dihydrolase, **TDA** : Tryptophane désaminase, **CIT** : Citrate de Simmons, **H₂S** : Thiosulfate de sodium.

4.4- Caractères antigéniques

L'antigène somatique « O », définissant le séro groupe, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à coloration de Gram négative. L'antigène flagellaire « H » est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène de surface « K » est présent de façon

inconstante mais bloque l'agglutinabilité de l'antigène « O » et donc le sérogroupage lorsqu'il est présent. L'identification des antigènes et sérogroupes a permis de différencier des souches pathogènes des souches commensales. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment (**Orskov., 1984**).

4.4.1- Les antigènes somatiques « O »

Les antigènes « O » sont des composés lipopolysaccharidiques complexes qui contiennent une fraction protéique qui rend l'ensemble antigénique. Plus de 176 antigènes somatiques différents ont été identifiés, la fraction polysidique contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 10 à 25 sucres dont la combinaison est responsable de la diversité et de la spécificité des antigènes « O » (**Stenutz et al., 2006**). Ces antigènes sont agglutinants en présence d'un immun sérum complémentaire et permettent le sérogroupage définissant un séroroupe. La synthèse de l'antigène peut être interrompue en culture avec le passage des colonies du type S (smooth, lisse) au type R (rough, rugueux) n'exprimant plus l'antigène « O ». L'absence de cet antigène empêche donc le sérotypage par les méthodes classiques mais un typage génétique reste cependant possible ; les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène « O » sont regroupés dans le « cluster de gène *rfb* ». L'amplification puis la restriction par l'endonucléase MboII permet l'obtention de profils permettant l'identification du séroroupe de ces souches R. Le séroroupe ainsi identifié sera noté par exemple R157 par analogie au séroroupe identique O157 obtenu par agglutination. Ce type d'identification permet en outre une caractérisation plus fine des souches que le sérogroupage classique (**Coimbra et al., 2000**).

4.4.2- Les antigènes flagellaires « H »

Le flagelle bactérien permet la mobilité. Cette fonction est clairement définie dans la pathogénie des *E. coli* uropathogènes (UPEC), il a été récemment montré que les flagelles facilitent l'ascension des souches UPEC de la vessie aux reins (**Lane et al., 2005**). La diversité des antigènes H tient à la variabilité des sous-unités de flagellines constituant le flagelle par polymérisation. Ces antigènes sont variables entre espèces mais aussi parfois au sein d'une même espèce et contribuent à définir le sérovar. Le typage s'effectue par séroagglutination mais n'est réalisé que par de rares laboratoires spécialisés. L'antigène « H »

est utilisé pour l'identification des *E.coli* pathogènes, pour la caractérisation précise des souches d'un même sérotype. Certaines souches peuvent perdre leur mobilité par perte d'expression du flagelle ; elles sont alors classées comme non mobiles (NM ou H-). De façon comparable au sérotypage par amplification restriction, un sérotypage moléculaire est possible pour les souches H-. Le traitement par amplification et restriction du gène « *fliC* » codant pour l'antigène « H » permet le typage de la souche et sera noté par exemple F7 correspondant au type H7 obtenu par agglutination (**Machado et al., 1998**).

4.4.3- Les antigènes de surface « K »

Les antigènes de surface aussi appelés antigènes de capsule ou d'enveloppe ou encore antigène Vi chez *Salmonella* sont des polysides acides qui ont été initialement divisés en trois types A, B et L. Ils masquent les antigènes somatiques « O » et empêchent le sérotypage lorsqu'ils sont présents.

- **L'antigène L**, thermolabile, est le plus fréquent. Le chauffage à 100°C pendant une demi heure le détruit et démasque l'antigène « O » le rendant accessible aux techniques de sérogroupage.
- **L'antigène A** est plus rare et correspond véritablement à un antigène capsulaire. Le chauffage à 100°C ne suffit pas à le détruire. Seul un autoclavage à 121°C durant une heure permet de démasquer l'antigène somatique.
- **L'antigène B** possède une thermolabilité intermédiaire entre les Ag L et A. Un chauffage à 100°C permet le sérogroupage mais ne supprime pas totalement l'antigène B. Un chauffage plus prolongé peut permettre de le détruire totalement (**Bidet et al., 2007**).

5- Facteurs de pathogénicité

L'étude des facteurs de pathogénicité des colibacilles a montré que dans l'espèce, il existe de nombreux variants exprimant des potentialités pathogènes diverses : les pathovars. Ces facteurs sont (**Johnson., 1991**) :

- **Une capsule** qui s'oppose à la phagocytose.
- **Des protéines de la membrane externe** et le **LPS** donnant aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément.
- **Des systèmes de captation du fer** : les sidérophores, fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication au détriment de la transferrine.
- **Des adhésines** : conférant aux souches qui les possèdent, la propriété de se fixer aux cellules épithéliales. De nature protéique elles sont portées le plus souvent par des pili communs. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogénèse des infections aux bactéries entériques.
- **Des toxines**
 - L'endotoxine, commune aux entérobactéries
 - Enterotoxine thermostable (ST) et thermolabile (LT) : ce sont des cytotoxiques qui agissent sur le contrôle enterocytaire de la sécrétion hydro électrolytique. La toxine LT est proche de la toxine cholérique.
 - Les cytotoxines *Shiga-Like Toxine* (SLT), SLT1 et SLT2 : ce sont des toxines qui altèrent l'intégrité des enterocytes.

6- Pathogénie

Les souches *E.coli* sont retrouvées dans le tractus gastrointestinal de nombreux animaux à sang chaud, dont l'homme, où elles jouent communément le rôle de bactérie commensale. Cependant, l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez les souches *E. coli* peuvent entraîner des modifications de leur comportement pouvant occasionner diverses infections telles des infections intestinales (syndromes diarrhéiques) ou extra-intestinales (infections urinaires, génitales, septicémies, infections digestives et méningites). Les souches de *E. coli* peuvent être regroupées en huit pathovars (**Johnson et Russo., 2005 ; Croxen et Finlay., 2010**). (Figure 01).

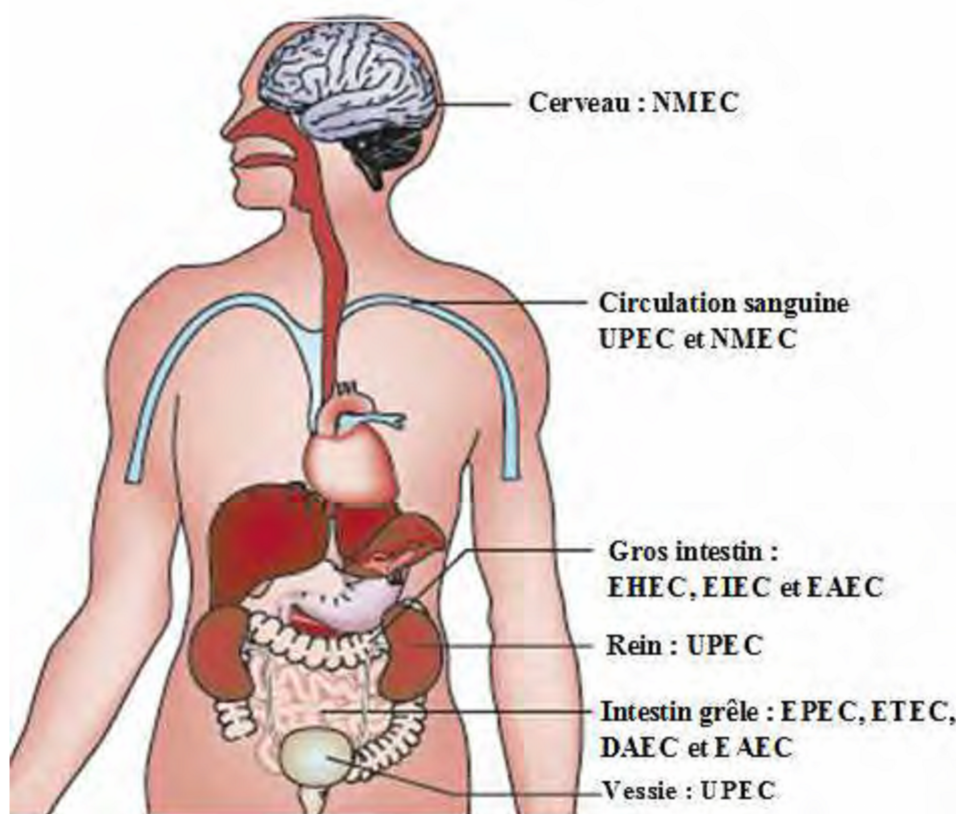


Figure 1. Sites de colonisation des *E.coli* pathogènes

E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhée, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasive (EIEC) colonisent plutôt le côlon; *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) peut coloniser les deux. *E. coli* uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (adapté de **Croxen et Finlay., 2010**).

6.1- Infection du tractus urinaire (ITU)

E.coli représente l'agent responsable de la très grande majorité des cas d'infections urinaires spontanées ou après instrumentation. Il est reconnu que les infections urinaires à colibacilles sont dues à la migration de ces bactéries du tube digestif vers l'arbre urinaire par voie ascendante et externe. Des raisons anatomiques expliquent leur plus grande fréquence chez la femme car l'urètre est plus court.

Les *E. coli* peuvent provoquer des infections urinaires hautes (prostatites, pyélonéphrites), et des infections urinaires basses (cystite aigue chez la femme). Cependant la contamination

vésicale par colibacille ne donne une infection urinaire et surtout une atteinte du parenchyme rénal, qu'avec certaines souches particulières capables d'adhérer aux cellules de l'arbre urinaire. Ces souches ont la capacité d'adhérer aux cellules uro-épithéliales et donc de s'implanter sur la muqueuse de l'arbre urinaire. Cela est dû à la présence des structures telles que l'adhésine, ou les pilis communs.

Les souches uropathogènes appartiennent plus fréquemment au sérotype (O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18, O75 et K1, K2, K3, K12, K13) qui possèdent de l'adhésine (**Wright et al., 2005**).

6.2- Septicémie/bactériémie

Les *E. coli* sont isolées dans 20% des septicémies et représentent 45% des septicémies dues aux bacilles à Gram négatif. Les pathovars incriminés dans la bactériémie sont caractérisés par un fort pouvoir invasif. Ils possèdent des systèmes de captation du fer nécessaire à leur croissance dans les tissus, des cytotoxines qui occasionnent des dégâts tissulaires en facilitant leur diffusion, de facteurs de résistance à la phagocytose et à l'action bactéricide du complément (**Mokady et al., 2005**).

6.3- Méningites

Elles surviennent surtout chez le nourrisson et environ 30% des méningites néonatales sont dues à *E. coli* sérotype K1. Elles s'accompagnent presque toujours d'un état bactériémique voir septicémique. L'infestation du nouveau né est certainement d'origine maternelle au moment de l'accouchement par passage à travers les voies génitale ou à la suite d'une infection ascendante du liquide amniotique par rupture prématurée des membranes. Les souches exprimant l'AgK1 sont largement prépondérantes dans ces infections. Ces souches représentent 80% des *E. coli* isolés des méningites (**Bonacorsi et al., 2005**).

6.4- Syndromes diarrhéiques

Les diarrhées infectieuses à *E. coli* sont causées par des souches virulentes qui sont absorbées par voie buccale avec de l'eau ou des aliments contaminés par la flore fécale de malades ou de porteurs sains. Les colibacilles à l'origine de ces infections sont des pathogènes spécifiques, elles colonisent la muqueuse digestive et entraînent une diarrhée selon plusieurs mécanismes (**Nataro et Kaper., 1998**).

6.4.1- Souches Entero toxinogènes ETEC (*Enterotoxinogen Escherichia coli*)

Ces souches sont une des causes les plus fréquentes de diarrhée de l'enfant dans les régions chaudes à hygiène déficiente (pays en voie de développement), et de la diarrhée du voyageur ou « Turista ». De plus, elles seraient à l'origine de graves syndromes cholériformes chez les enfants et les adultes dans les régions d'endémie de choléra. Leur pouvoir pathogène est lié à un antigène qui leur permet d'adhérer aux cellules de l'intestin grêle et de se multiplier à leur surface sans y pénétrer, d'autre part, à la production de toxine qui dérègle le mécanisme normal d'excrétion/d'absorption. La toxine thermolabile (LT), immunologiquement apparentée à la toxine cholérique (formée de deux sous unités A et B) et agit par le même mécanisme. Elle se fixe aux gangliosides des cellules intestinales par une de ses sous unités « B » qui permet le passage intra cellulaire de la sous unité active « A », qui active l'adényl cyclase ; l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire entraîne la perte de Na⁺, HCO₃⁻ et Cl⁻ et une fuite d'eau. La toxine thermostable (ST) se fixe sur des récepteurs cellulaires de la bordure en brosse intestinale (ses récepteurs sont plus nombreux chez l'enfant, ce qui expliquerait la gravité des diarrhées dans ce cas) active la guanylate cyclase des enterocytes et entrainerait aussi une fuite hydro-électrolytique (Nataro et Kaper., 1998).

6.4.2- Souches Enteroïnvases : EIEC (*Enteroinvasive Escherichia coli*)

Les souches EIEC sont à l'origine d'un syndrome dysentérique identique à celui observé au cours des *shigelloses*. Cette diarrhée fébrile, mucopurulente, atteint l'enfant ou l'adulte et évolue par petites épidémies limitées. Les souches responsables sont biochimiquement et antigéniquement très proches des *Shigelles*. On a EIEC O: 28, EIEC O: 112, EIEC O: 124; EIEC O: 136, EIEC O: 143; EIEC O: 147, EIEC O: 157. Ces souches envahissent la muqueuse colique, car elles sont phagocytées par les cellules épithéliales à la suite d'une interaction spécifique entre la cellule et la bactérie. Les bactéries sont internalisées dans une vacuole cytoplasmique qu'elles lysent rapidement, pour se multiplier librement dans le cytoplasme de ces cellules qui entraîne la mort de la cellule. Après cette phase de multiplication cellulaire, les bactéries provoquent une réaction inflammatoire intense avec des micro-abcès dans la muqueuse (Stenutz et al., 2006).

6.4.3- Souches Entero hémorragiques dites EHEC

Ces souches sont responsables de diarrhée sanglante, sans pus et de colite hémorragique survenue après ingestion d'aliments souillés. Il s'agit, en fait d'une colite ischémique aigue qui pourrait être due à la sécrétion en quantité abondante d'une cytotoxine SLT1 (Shiga Like

Toxine ou vérotoxine) par ces souches de *E. coli*. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) serait probablement dû aux effets de cette toxine sur l'endothélium des capillaires rénaux et sur les cellules circulantes (hématies). Ces souches sont EHEC O : 157: H9 mais aussi EHEC O : 26 ; EHEC O : 111 (Tozzi et al., 2003).

6.4.4- Souches Enteropathogènes : EPEC (*Enteropathogen Escherichia coli*)

Elles sont la cause d'épidémies très fréquentes en milieu pédiatrique, surtout dans les pays en voie de développement. Elles sont rares dans les pays développés. Ces infections atteignent uniquement les nourrissons de moins de deux (02) ans et entraînent une diarrhée sévère avec vomissements et une déshydratation aigue (Croxen et Finlay., 2010). Les souches responsables de ces gastro entérites infantiles appartiennent au sérotype O (O26, O55, O86, O111, O119, O125, O127, O128, O142). Le mécanisme physiopathologique est imparfaitement élucidé. Ces souches tapissent l'épithélium intestinal du duodénum et du jéjunum sans l'envahir. Elles adhèrent étroitement aux entérocytes, entraînant la disparition des villosités. Leur adhésion aux cellules est codée par un plasmide. La disparition ou la destruction des villosités est due à la production d'une cytotoxine dite vérotoxine capable de lyser les cellules Véro (VT). Cette toxine est apparentée à la toxine dysentérique *Shiga-Like Toxine1* (SLT1) et serait la cause de la diarrhée et des lésions des cellules épithéliales. (Campos et al., 2004)

6.4.5- Souches Entéro-Aggrégative (ECEAgg)

Les ECEAgg sont des souches qui ne sécrètent pas les entérotoxines LT ou ST et qui adhèrent aux cellules de culture en formant des images « d'amas de brique » (adhésion aggrégative). Les ECEAgg sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retard de croissance et de diarrhée persistante dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Les ECEAgg adhèrent sur la muqueuse intestinale en étant enchâssés dans un biofilm de mucus produit par les cellules de la muqueuse. Environ 40% des souches d'ECEAgg produisent l'entérotoxine EAST1 (Enterotoxine Aggrégative *E. coli* Heat Stable enterotoxin) qui représente environ 50% d'homologie avec la toxine ST des ETEC (Nataro et Kaper., 1998).

6.4.6- *Escherichia coli* adhésion diffuse ECAD (*Diffuse Adhesing E. coli*)

Ces souches, tout d'abord classées avec les *E. coli* Enteropathogènes, forment maintenant un groupe à part du fait de leur phénotype d'adhésion particulier qui n'implique pas d'agrégats microbiens. Deux marqueurs caractérisent ces souches : l'antigène fibrillaire de surface F1845 associé à un *frimbriae* (pili) et la protéine « adhesin involved in diffuse adherence » (AIDA1).

Il faut noter qu'il existe d'autres espèces de *E. coli* au sein du genre *Escherichia* : *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae* (retrouvé chez la blatte). Toutefois, leur pouvoir pathogène est considéré comme faible (**Servin., 2005**).

7- Epidémiologie

Les souches bactériennes responsables d'entérites sont transmises par ingestion à partir de l'environnement (eau, aliments) contaminée par les selles de malades ou de porteurs sains. Les *EPEC* sont responsables d'épidémies meurtrières de gastroentérites infantiles dans les pays du tiers monde. Elles représentent un problème de santé publique.

Les *ETEC* sont répandues dans le tiers monde. C'est l'un des agents le plus souvent responsable de diarrhées du petit enfant, de diarrhées des voyageurs ou d'épidémie de toxi-infections alimentaires dans les pays occidentaux. Ces souches sont responsables de syndromes cholériques très graves, en Inde notamment où on les a décrites pour la première fois en 1960 (**Simonet et al., 1991**).

Les *EHEC* sont à l'origine d'épidémie de diarrhées hémorragiques découvertes en 1982 aux Etats Unis, à l'occasion de deux épidémies de colite hémorragique sévère reliées à la consommation de hamburgers insuffisamment cuits dans une chaîne de restauration rapide. Depuis cette date, plusieurs épidémies importantes consécutives à la consommation d'aliments contaminés par les *Shiga Toxin producing E. coli* (STEC) ont été observées : à Washington en 1993, au Japon en 1996. Toutes ces épidémies étaient dues aux sérotype O157 :H7 (**Guy et Elisabeth., 2007**).

En France, deux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été décrites : l'une due à *E. coli* O157 en décembre 2000 (10cas), l'autre à un STEC non O157 (O148 :H8) en juin 2002, incriminant de la viande de mouton. En Avril 2011 on a assisté à une épidémie de toxi-infection alimentaire à *E. coli* O104 :H4 en Europe, cette épidémie a commencé en Allemagne et a touché 4075 personnes avec 50 décès (**OMS., 22/07/2011**).

Dans les infections extra-intestinales, l'origine est endogène le plus souvent avec des bactéries qui sont des hôtes normaux du tube digestif (**Simonet et al., 1991**).

Les infections urinaires, néo-natales et aussi nosocomiales, trouvent surtout leur origine dans la flore endogène du tube digestif ou du tractus génital, mais peuvent également être transmises d'un sujet à l'autre à partir du matériel contaminé. Les pyélonéphrites seraient causées dans 60 à 80% des cas par les souches de *E. coli* uropathogènes (**Flandrois., 1997**).

Chapitre 2. Résistance de *E. coli* aux antibiotiques

1- Les antibiotiques

1.1- Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est-à-dire produit par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire les micro-organismes (**Yala et al., 2001**). C'est en 1941 que fut utilisé pour la première fois un antibiotique, la pénicilline, découverte en 1928 par le bactériologiste anglais Alexander Fleming pour traiter un patient atteint de septicémie à staphylocoques (**Fleming., 1929**).

1.2- Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un important groupe de médicaments pour la médecine. À côté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire. Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre (figure 02):

- Action sur la paroi bactérienne;
- Action sur la structure de la membrane;
- Action sur la synthèse protéique;
- Action sur la synthèse de l'ADN;
- Action sur le métabolisme de l'acide folique (**Clive P Page., 1999**).

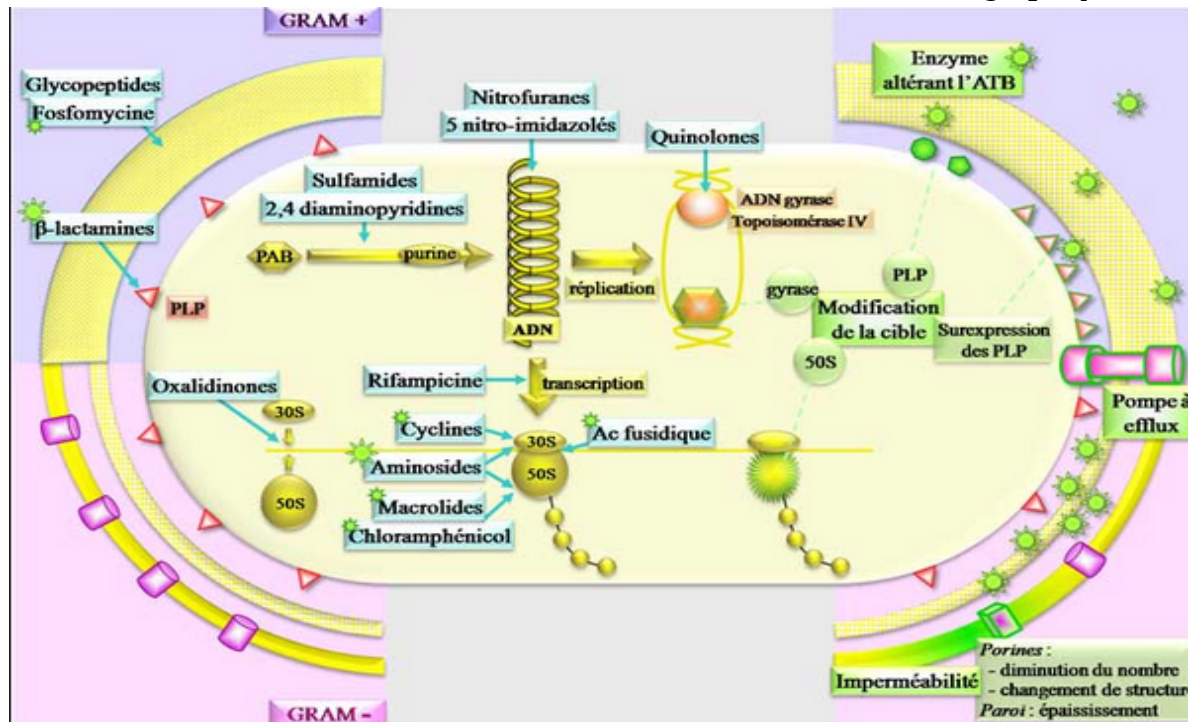


Figure 2. Cibles des principaux antibiotiques (www.memobio.fr).

1.2.1- Mode d'action des β-lactamines

Les β-lactamines, analogues structuraux de la terminaison peptidyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane, ont pour fonction d'interagir avec un groupe de protéines, les PLPs, également appelées protéines de fixation de la pénicilline (PBP, pour Penicillin Binding Protein), des enzymes responsables de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane (**Ghuysen., 1991 ; Nanninga., 1991**). L'inhibition de ces transpeptidases, impliquées dans l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire, le cycle β-lactame se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation. Il entraîne une interruption de la synthèse du peptidoglycane et une production subséquente d'enzymes autolytiques entraînant la mort cellulaire (**Stratton., 2000**). Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi cellulaire présent chez toutes les bactéries. Il forme un réseau tridimensionnel autour de la cellule et la protège de sa propre pression osmotique, et est essentiel à la croissance et à la division cellulaire (**Matagne et al., 1998**). Il s'agit d'un polymère formé de chaînes linéaires composées de répétitions alternatives d'un disaccharide contenant le N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM). Le dernier sucre de ce disaccharide se termine toujours par deux résidus D-alanine. L'assemblage final de ces unités, la transpeptidation, est un processus catalysé par les PBP se terminant par le clivage du résidu D-alanine terminal (**Wilke et al. 2005**).

1.2.2- Mode d'action des aminosides

Les aminosides ou encore aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides à large spectre utilisés presque exclusivement en association. Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse protéique. Ils franchissent la membrane externe par les porines et traversent la membrane cytoplasmique par un phénomène actif nécessitant un système transporteur d'électrons et l'oxygène comme accepteur final. Les bactéries anaérobies, ainsi que les streptocoques et les entérocoques sont naturellement résistantes car ils sont dépourvus de ce système. Dans le cytoplasme des bactéries sensibles, ils se fixent à la sous-unité 30s de l'ARN ribosomal et provoquent des erreurs de reconnaissance codons-anticodons et l'incorporation d'acides aminés erronés dans la chaîne peptidique en formation. Les protéines anormales sont intégrées dans la membrane cytoplasmique qui perd ainsi son intégrité ; ce qui confère aux aminosides un effet bactéricide puissant et rapide. Ils sont inactifs sur les streptocoques et entérocoques, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas stutzeri*, anaérobies stricts, spirochètes, bactéries intracellulaires (**Perlemuter., 1993**).

1.2.3-Mode d'action des quinolones

Les quinolones agissent en inhibant le fonctionnement de l'ADN. En effet, l'ADN-gyrase produit une série de coupures et de ligations des brins d'ADN, ce qui permet le relâchement de la molécule puis son enroulement. Au moment de la coupure, l'ADN et la gyrase sont transitoirement liés de manière covalente. Après pénétration passive des quinolones dans le cytoplasme bactérien, ils agissent sur ce complexe transitoire en formant un complexe ternaire irréversible ADN-gyrase-quinolone. Au sein des quinolones, on distingue les quinolones de première génération actives principalement sur les BGN (et utilisées, chez l'homme, uniquement dans le traitement des infections urinaires) et les quinolones de deuxième génération caractérisées par un spectre plus large (**Perlemuter., 1993**).

2- Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques

L'utilisation répétée et souvent abusive des antibiotiques tant chez l'homme que chez l'animal favorise l'émergence et la sélection de bactéries résistantes fréquemment associées aux échecs thérapeutiques (**Levy., 1997**). En effet, en réponse à la pression de sélection des antibiotiques, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes de résistance à ces molécules. Si ces moyens de défense sont exprimés à l'état

naturel chez toutes les bactéries d'une espèce, il s'agit de résistance naturelle. S'ils sont portés uniquement par certaines bactéries de l'espèce, la résistance est dite acquise.

2.1- Types de résistance

2.1.1- Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en oeuvre d'un processus d'échappement vis à vis de l'antibiotique.

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques (Levy., 1997).

2.1.2- Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques.

L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition de gènes de résistance exogènes.

La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β -lactamines illustre parfaitement ce phénomène (Levy., 1997).

3- Supports génétiques de la résistance

Parmi les modalités d'acquisition de la résistance aux antibiotiques, le transfert horizontal de gènes est un élément-clé. Différents éléments génétiques sont impliqués dans ce transfert de gènes (**Gansmandel., 2011**).

3.1- Le chromosome

- **Résistance naturelle**

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie (**Gansmandel., 2011**).

- **Résistance acquise**

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler. La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurale responsable de la résistance ; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale (**Gansmandel., 2011**).

3.2- Les éléments génétiques mobiles

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégrons. Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bacteriophages) (**Bennett., 2008**). (Figure 3).

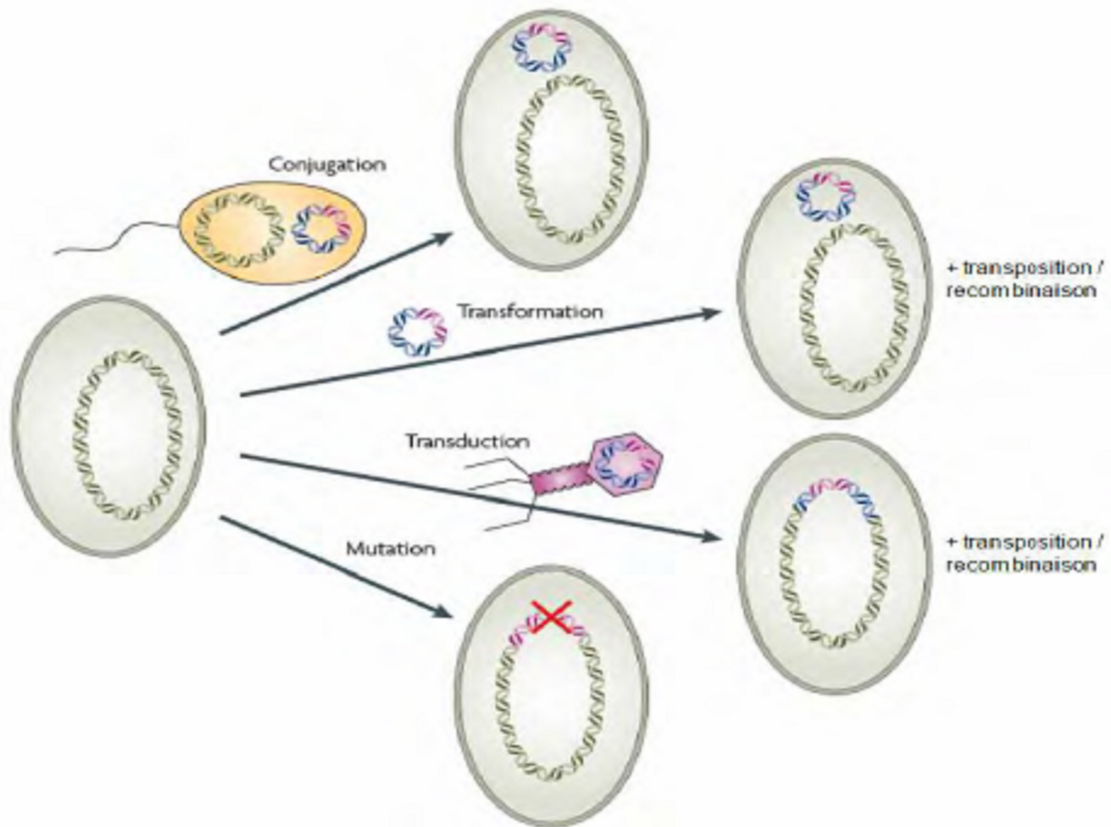


Figure 3. Les trois modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries. Modifiée de (Andersson et Hughes., 2010).

3.2.1- Les plasmides

Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. Comme les chromosomes, les plasmides codent pour des protéines et des molécules d'ARN et se répliquent durant la croissance bactérienne. Contrairement aux chromosomes, les plasmides ne portent toutefois pas de gènes essentiels à la croissance bactérienne. Ils codent plutôt pour des protéines dont la fonction est de conférer un avantage sélectif comme la résistance aux antibiotiques ou encore des facteurs de virulence (Snyder et Champness., 2007).

3.2.2- Séquences d'insertion et transposons

Les séquences d'insertion, aussi appelées éléments IS, sont de courtes séquences d'ADN qui portent uniquement le gène codant pour la protéine responsable de la transposition, la transposase, et les sites reconnus par cette enzyme. Ces sites sont des séquences inversées

répétées situées à chaque extrémité de la séquence d'insertion. Ces éléments transposables jouent un rôle très important dans l'évolution des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de multiples réarrangements de leur génome. Les transposons sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison (**Snyder et Champness., 2007**).

3.2.3- Les intégrons

Les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à coloration de Gram négative. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), est majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique. Les intégrons ont une organisation commune permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes. Les intégrons, supports majeurs de la multirésistance aux antibiotiques, peuvent contenir jusqu'à 8 cassettes. Les intégrons de classe 1, 2 et 3, il a été montré que les cassettes étaient majoritairement composées de gènes de résistances aux β -lactamines, aminosides (gènes *aad*) et au triméthoprim (gènes *dfr*). Plusieurs intégrases d'intégrons (IntI) ont été décrites chez des souches bactériennes cliniques et environnementales. Les intégrases des souches cliniques sont généralement codées par des gènes portés par des plasmides alors que celles des souches environnementales sont codées par des gènes situés sur des chromosomes (**Partridge et al., 2009**).

4- Mécanismes de la résistance

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques est apparu rapidement après leur introduction en thérapeutique avec comme conséquence une diminution d'activité voire une inefficacité totale des molécules habituellement actives.

Aujourd'hui le risque d'échec thérapeutique, la variété des résistances, la vitesse de leur évolution ainsi que leur capacité de dissémination sont des paramètres majeurs à prendre en compte dans la lutte contre ce phénomène. Des mécanismes essentiels de la résistance bactérienne permettent à la bactérie de se soustraire à l'action de l'antibiotique présent dans le milieu et peuvent s'observer séparément ou de manière concomitante (**Gansmandel., 2011**).

4.1- Le cas des β -lactamines

4.1.1- Mécanismes de résistance aux β -lactamines non enzymatiques

4.1.1.1- Diminution de la perméabilité

La perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif dépend principalement du lipopolysaccharide (LPS) et des porines ancrées dans cette membrane. Le LPS est très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés et formés de structures hydrophiles grâce à ses charges électriques de surface. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée comme la pénicilline G, les macrolides et les glycopeptides.

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Ainsi, la sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente. Chez *E. coli*, deux porines principales sont présentes : OmpF et OmpC (Effler et al., 2001).

4.1.1.2- Hyperproduction de système d'efflux

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif. Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques.

L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux β -lactamines a été clairement identifiée dans plusieurs études en particulier chez *K. pneumoniae*. Cependant ce type de mécanisme touchant préférentiellement la céfoxitine et les C2G semble difficile à distinguer du point de vue phénotypique des résistances par modification des porines (Robin et al., 2012).

4.1.1.3- Modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP)

Ces PLP modifiées présentent une affinité plus faible pour les β -lactamines. Elles sont relativement résistantes à l'inactivation par les pénicillines et sont capables de remplir les fonctions des PLP lorsque ces dernières sont inactivées. Ce mécanisme de résistance est majeur pour les bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et les entérocoques (Zapun et al., 2008).

4.1.2- Mécanismes de résistance aux β -lactamines enzymatiques

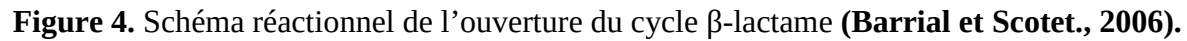
A l'heure actuelle, la production d'enzymes hydrolytiques appelées β -lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des β -lactamines. Au début des années 1980, seules quelques enzymes de type plasmidique comme TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues, mais rapidement après l'introduction d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines de troisième génération, sont apparues des β -lactamases à spectre étendu ou BLSE, ainsi que des carbapénémases. Depuis, les β -lactamases ne cessent de se diversifier, d'élargir leur spectre d'activité et leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries (Faure., 2009).

4.1.2.1- Production des β -lactamases

Les β -lactamases ont été identifiées en 1940 par Abraham et Chain, qui ont mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (Abraham et Chain., 1940).

Les β -lactamases sont des enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle bêtalactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (Ambler., 1980). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros., 1984). La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli., 2007), et est également un facteur de diffusion.

Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Figure 4). Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque (Medeiros., 1984).



➤ Classification

- ✓ **Classification d'Ambler:** Initialement proposée par Ambler (**Ambler., 1980**), cette classification repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β -lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de

chaque β -lactamase et ne change pas à cause des mutations. Cette nomenclature se compose de quatre groupes, soit les β -lactamases de classe A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallob- β -lactamases (carbapénémases) (Jacoby et Munoz-Price., 2005). (Tableau 2)

Tableau 2. Classification selon Ambler des principales β -lactamases d'après (Nordmann *et al.*, 1998).

Classe	Localisation	Spectre d'activité	Types d'enzymes	Organisme
A	Chromosome	Spectre restreint	TEM-1,2 et SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	TEM-3-29, 42, 43, SHV-2-9 PER-1,2 CTX-M, CTX-M2, MEN-1, VEB-1, TOHO-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Plasmide	β -lactamases résistantes aux inhibiteurs	TEM-30-41, 44 et 45	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i> ++
	Plasmide	β -lactamases résistantes aux inhibiteurs et à large spectre	SHV-10, TEM-33 et 15	<i>E. coli</i>
	Chromosome	Carbapénémases	Nmc A, Sine-1, IMP-1	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i>
B	Chromosome Plasmide	Carbapénémases	IMP-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	Plasmide	Céphalosporinases	MIR-1, MOX-1, CMY-1, 2 1.AT-1, BIL-1, FOX-1, ACT-1	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> ++
	Chromosome		AmpC	Bacille Gram négative
D	Chromosome Plasmide		OXA-24-26,40,51,58,72	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

❖ Les β -lactamases de classe A

Les β -lactamases de classe A, d'origine chromosomique ou plasmidique, se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de β -lactame. Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70)- induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et de céphalosporoate, analogue aux pénicillinoates, pour les céphalosporines. Cette sérine est retrouvée dans le site actif de la β -lactamase qui se compose d'hélices α entourées de cinq feuillets β anti-parallèles (**Knox., 1995**) et assure un fort taux de résistance aux pénicillines, céphalosporines et carbénicillines. Toutefois, les β -lactamases de classe A sont généralement sujettes à l'inhibition par les inhibiteurs de β -lactamases (**Livermore., 1995**).

❖ Les β -lactamases de classe B

Les β -lactamases de classe B sont des métallo- β -lactamases et utilisent un ion de zinc (Zn^{2+}) comme cofacteur permettant ainsi la décomposition de l'anneau β -lactame (**Ambler., 1980 ; Bandoh et al., 1991**). Ces enzymes ont été émergés depuis une dizaine d'années, d'abord chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, puis ensuite chez les entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif.

L'importance clinique des métallo-bêta-lactamases est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des bêta lactamases à sérine active. La plupart des métallo-bêta-lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs suicides classiques (**Bebrone., 2007**).

❖ Les β -lactamases de classe C

Les β -lactamases de classe C, décrites en 1981 par **Jaurin et Grundstrom**, ont longtemps été ubiquitaires aux chromosomes de différentes espèces bactériennes entériques (**Jaurin et Grundstrom., 1981**).

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases AmpC qui sont codées par des gènes qui étaient primitivement situés sur le chromosome de nombreuses bactéries à Gram négatif telles que *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter* spp. Chez ces bactéries, l'expression de AmpC est inductible. Les gènes codant pour ces enzymes sont aussi présents chez *E. coli*, où ils ne sont

pas inductibles. Ces enzymes sont résistantes à l'acide clavulanique (**Philippon et al., 2002**).

❖ Les β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D se distinguent par leur capacité à hydrolyser les pénicillines isoxazolyl (oxacilline) et la méthicilline, et qui sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. Elles sont retrouvées fréquemment chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (OXA-11, 14, 16, 17 et 19) et peu chez les entérobactéries (**Paterson et Bonomo., 2005**).

De plus, certains membres de cette famille, dont OXA-10 (PSE-2) et OXA-11 (**Hall et al., 1993**), possèdent un large spectre d'activités assurant une forte résistance aux céphalosporines de troisième génération dont la céfotaxime, le céfoperazone et la ceftazidime (**Hall et al., 1993 ; Livermore., 1995**).

4.1.2.2- Production des céphalosporinases plasmidiques

Les céphalosporinases plasmidiques ou case plasmidiques, sont des β -lactamases de la classe C, avec un phénotype de résistance identique à celui des céphalosporinases hyperproduites qui se traduit généralement par une résistance aux C3G, associé avec une résistance à l'acide clavulanique et souvent à la céfoxitine, à l'exception de l'imipénème (**Philippon et al., 2002**). Il s'agit d'un phénotype retrouvé principalement chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase ampC qui peut être alors surexprimée (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, autres entérobactéries du même groupe).

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par Amp-C (**Hanson., 2003**). La transmission plasmidique dans la famille des entérobactéries entraîne des taux très élevés de céphalosporinases chez *E. coli* qui porte un gène AmpC constitutif est faiblement exprimé (**Bush., 2001**). Chez des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, cette résistance a été décrite pour la première fois avec MIR-1 en 1988, aux États-Unis (**Philippon et al., 2002**). Et la première enzyme de type DHA a été identifiée en 1992, à Dhahran, en Arabie Saoudite, chez une souche clinique de *Salmonella enterica* sérotype *Enteritidis* (**Fortineau et al., 2001 ; Gaillot et al., 1997**). La découverte de "céphalosporinases plasmidiques" originaires d'entérobactéries, indiquait une nouvelle et importante étape de la résistance acquise aux antibiotiques (C3G en particulier) par mobilisation de gènes chromosomiques (**Philippon et al., 2002**). Les enzymes plasmidiques sont, le plus souvent, non inductibles, à l'exception de

ACT-1, de DHA-1 et de CFE-1 (**Nakano et al., 2004**). Par séquençage, il a été démontré la présence d'un gène régulateur *ampR* en amont du gène de structure *ampC* (**Barnaud et al., 1998**). Lorsqu'il est lié à la pentapeptide UDP-Mur-NAC, AmpR réprime l'expression de *ampC* et sa propre transcription, et cette inactivation peut être régulée par la présence de β -lactames comme la céfoxitine, l'acide clavulanique, et de l'imipénème ou par des mutations dans le *AMPD* gène.

Recemment, pour plusieurs de ces enzymes transférables, les progéniteurs ont été identifiés : groupe BIL-1, CMY-2, LAT-1,2 dérivées de *Citrobacter freundii*, DHA-1 (*Morganella morganii*), MIR-1, ACT-1 (*Enterobacter cloacae*), et ACC-1 (*Hafnia alvei*), ou encore de *P.aeruginosa* (CMY-1, FOX-1, MOX-1) (**Hanson., 2003 ; Philippon et al., 2002**).

4.1.2.3- Production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (**Knothe et al., 1983**), il n'y a pas de consensus concernant la définition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (À l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et l'aztréonam. Elles sont inhibées *in vitro* par les inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (**Livermore., 1995**). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et céfoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (**Paterson et Bonomo., 2005**). Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries. La présence de ce -type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (**Schwaber et Carmeli., 2007**), et est également un facteur de diffusion. Au sein des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli* sont les deux espèces les plus fréquemment porteuses de ces mécanismes de résistance. Toutefois, ces enzymes ont été retrouvées au sein de nombreuses autres espèces bactériennes, entérobactéries et bacilles non fermentants (tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (**Jacoby et Munoz-Price., 2005**).

4.1.2.3.1- Différents types de BLSE

Elles sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM, SHV, CTX-M (Jacoby et Munoz-Price., 2005).

✓ BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient)

La première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à partir d'une souche de *E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination (Datta et Kontomichalou., 1965). La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (Bradford., 2001). Une seule de ces substitutions peut entraîner une importante modification de l'affinité de l'enzyme. Par exemple, lorsque l'acide aminé devient une sérine, l'interaction entre le $-NH_3$ de la sérine et le groupement oxy-amino des C3G se traduit par une meilleure stabilité de la β lactamine dans le site actif de l'enzyme. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes (Rodriguez-Villalobos et Struelens., 2006). Actuellement, il y a plus de 210 enzymes TEM ont été décrits (<http://www.lahey.org/studies/>).

✓ BLSE de type SHV : (Sulfhydryl variable)

Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *bla_{SHV}* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (Brisse et Verhoef., 2001 ; Haeggman et al., 2004). Actuellement, plus de 180 variants SHV BLSE ont été décrits (<http://www.lahey.org/Studies/>), et cette désignation SHV est liée au sulfhydryl variable. La majorité des BLSE de type SHV est caractérisée par la substitution d'acides aminés Gly238Ser ou Gly238Ser et Glu240Lys. Le résidu sérine à la position 238 est indispensable pour l'hydrolyse efficace du céfotaxime et le résidu lysine est crucial pour l'hydrolyse efficace de la ceftazidime (Elhani., 2012). La majorité des BLSE de type SHV ont été décrites chez les souches de *K.pneumoniae*, toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* (Bradford., 2001). Ainsi, ces enzymes sont aussi présentes chez les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter*

spp (Naïemi et al., 2005 ; Poirel et al., 2004). La présence de la séquence d'insertion IS26 sur le gène SHV faciliterait l'acquisition du phénotype BLSE (Hammond et al., 2005).

✓ **BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich)**

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM-1) et ont depuis lors disséminé largement dans le monde (Thomson et Moland., 2000). Ces « nouvelles » enzymes représentent à l'heure actuelle les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial après leur diffusion rapide depuis les années 90 (Bonnet., 2004 ; Livermore et al., 2007). Le groupe CTX-M (pour céfotaximase) conférait à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime (Arlet et Philippon., 2003 ; Bonnet., 2004). Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 et CTX-M-32 (Bonnet., 2004). Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Récemment, plus de 150 variants CTX-M ont été décrits (<http://www.lahey.org/Studies/>) et ont été classés en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1 avec M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ; le groupe CTX-M-2 avec M-4, 5, 6, 7, 20, et Toho-1 ; le groupe CTX-M-8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ; le groupe CTX-M-9, avec M-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27, le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45.

Ces nouvelles BLSE ne sont pas étroitement liées aux β -lactamases de type TEM ou SHV puisqu'elles ne présentent que 40 % d'homologie avec ces BLSE classiques (Elhani., 2012).

Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, entérobactéries d'isolement très rare en bactériologie médicale (Bonnet., 2004 ; Humeniuk et al., 2002). La β -lactamase naturelle de *Kluyvera cryocrescens* (KLUC-1) présente 95 à 100 % d'identité avec les enzymes plasmidiques du phylum CTX-M-1 (Decousser et al., 2001). Ainsi le phylum CTX-M-2 dérive de la β -lactamase naturelle de *Kluyvera ascorbata* (codé par le gène *bla_{KLUA}*) alors que le phylum CTX-M-8 vient de *K. georgiana* (codé par le gène *bla_{KLUG}*) (Poirel et al., 2002), cette espèce serait également à l'origine du groupe 9 (Olson et al., 2005). La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue *via* des plasmides conjugatifs mais aussi *via* d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion ISEcp1 (Bradford., 2001).

✓ Autres types de BLSE

D'autres BLSE ont une distribution moins large, caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime (**Arlet et Philippon., 2003 ; Bradford., 2001**), qui sont individualisées en BES-1 (*brazilian extended spectrum*), GES-1 (*Guyana extended spectrum*), PER-1 (*Pseudomonas extended resistance*) (Weldhagen et al. 2003), SFO-1 (*Serratia fonticola*), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine), et VEB-1 (*Vietnam extended spectrum*). Des enzymes proches de GES-1 ont été découvertes en Grèce, malheureusement dénommées à tort IBC (*integron borne cephalosporinase*) (IBC-1, IBC-2) (**Philippon et Arlet., 2006**). En fin, l'OXA-1 qui a une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline.

4.1.2.3.2- Epidémiologie des BLSE

Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement été diffusés dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Au cours des années 1990-98, elles ont été responsables de grandes épidémies de colonisations et d'infections nosocomiales en particulier dans les services de soins intensifs où l'utilisation des C3G est très commune. Elles sont principalement liées aux espèces *K. pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* (**Paterson et al., 2005**). De plus, les plasmides de *K. pneumoniae* ont une très grande stabilité. Ainsi, des années après l'arrêt du traitement par la ceftazidime ou d'autres C3G, des *K. pneumoniae* BLSE colonisent toujours certains malades (**Hibbert et al., 1995**). A la fin des années 90, un renversement de situation avec l'émergence des CTX-M était noté. En effet, après une diminution significative des BLSE de type TEM et SHV, la prévalence des CTX-M a explosé. Ces dernières sont devenues endémiques sur tous les continents (**Hawkey et al., 2009**). L'épidémiologie actuelle est dominée par la diffusion de l'enzyme CTX-M-15 (**Gniadkowski., 2008**). Bien que *E. coli* producteur de CTX-M représente actuellement la majorité des BLSE, on observe depuis quelques années une ré-augmentation de la prévalence des KpBLSE dans les hôpitaux.

Les données recueillies de janvier 2004 à août 2006 (4916 isolats) en Asie, en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique Latine indiquent que la prévalence des *K. pneumoniae* productrices de BLSE (KpBLSE) était plus élevée en Amérique latine (44%) et en Asie (22,4%) qu'en Europe (13.3%) ou en Amérique du Nord (7.5%) (**Woodford et al., 2004**). En Europe, la Grèce était le pays où la prévalence de *K. pneumoniae* BLSE était la plus élevée (44%) alors qu'aucune souche n'était rapportée au Danemark, en Finlande, en Suisse, en Autriche, en Irlande, en République Tchèque et en Hollande. En Amérique latine, des

épidémies à KpBLSE (CTX-M-1 ou CTX-M-2) ont été décrites (**de Oliveira et al., 2008**). En Asie, la place des CTX-M semble largement prédominante chez *K. pneumoniae*. En revanche, en Amérique du Nord, les enzymes de type SHV, notamment SHV-5 restent les plus fréquentes et, parfois encore à l'origine d'épidémies. Ainsi, les BLSE de type SHV (SHV-2, -2a, -5 et -12), semblent persister sur tous les continents, notamment en Europe (**Canton et al., 2008**). En Algérie, le gène CTX-M-15 reste le plus impliqué dans les épidémies hospitalières, après sa première détection dans un hôpital à Bejaia par *Touati et al* en 2005, ce qui confirme la diffusion mondiale de ce gène (**Touati et al., 2006**). En 2009, la prévalence des KpBLSE à l'est de l'Algérie avoisinait les 60% (**Nedjai et al., 2012**). Par ailleurs, cette prévalence a dépassé les 80% à l'ouest de l'Algérie en 2012 (**Baba et al., 2013**), ce qui signale l'augmentation du taux des KpBLSE au niveau des hôpitaux Algériens. Enfin, les BLSE plus rares, comme PER ou VEB, ont des répartitions géographiques différentes. Ainsi l'enzyme VEB-1 est très répandue dans le sud-est asiatique alors que PER-1 est prépondérante en Turquie et PER-2 n'a été décrite qu'en Argentine (**Quinteros et al., 2003**) et l'enzyme TLA-1 au Mexique (**Canton et al., 2008**). En Algérie, les enzymes PER-1 ou VEB-1 ont été observés de façon sporadique chez *Proteus* (**Iabadene et al., 2009**) et *Enterobacter* (**Iabadene et al., 2008**).

4.1.2.4- Production des carbapénémases

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent à trois classes selon la classification d'Ambler (**Nordmann et al., 2010**) : les classes : A, B et D.

4.1.2.4.1- Épidémiologie mondiale des carbapénémases

- **Carbapénémases de classe A** : Les enzymes du type KPC (*K. pneumoniae* productrice de carbapénémases) sont les plus fréquemment rencontrés dans ce groupe (**Nordmann et al., 2011**). Depuis le premier rapport sur cette enzyme en 1996, où elle a été isolée à partir d'une souche clinique de *K. pneumoniae* en Caroline du Nord, États-Unis (**Yigit et al., 2001**), ces enzymes ont été détectés le plus souvent chez *Klebsiella* spp (**Nordmann et al., 2011**), mais ils ont été également détectés chez d'autres souches d'entérobactéries à travers le monde (**Deshpande et al., 2006**) : en Italie (**Nordmann et al., 2011 ; Grundmann et al., 2010**), en Espagne, en France et en Grèce (**Carbonne et al., 2010 ; Gómez et al., 2010 ; Nordmann et al., 2009**),

l'Amérique du Sud, le Moyen-Orient (**Cuzon et al., 2010**) et en Afrique (**Naas et al., 2008**).

Les carbapénèmes de classe A n'ont jamais été détectés dans les pays d'Afrique du Nord, cependant, en Algérie le gène KPC a été isolé à partir d'une souche de *E.coli* en mai 2014 à Annaba (**Djahmi et al., 2014**). Quelque mois après cette découverte (Novembre 2014), ce gène a été détecté chez une souche de *K. pneumoniae* isolée à Sétif à partir d'un Liquide-céphalo-rachidien d'un enfant de 6 mois (**Bakour et al., 2012**).

- **Carbapénémases de classe B (Métallo- β -lactamases) :** Les enzymes de type VIM (*Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase*) et IMP (Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1).

La première métallo β -lactamase de type IMP a été décrite au Japon en 1991 (**Ito et al., 1995**). Depuis, ce type d'enzyme a diffusé dans le monde entier et les enzymes de type VIM et IMP sont désormais : endémiques dans certains pays tels que la Grèce, l'Italie, l'Espagne, Taiwan et le Japon (**Nordmann et al., 2011**). La plupart des souches productrices de métallo- β -lactamases sont des *K. pneumoniae* multirésistantes acquises dans les établissements de soins. La mortalité associée à ce type de souches varie de 18 à 67% (**Nordmann et al., 2011**).

Les enzymes de type VIM (*Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase*) et IMP (Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1).

La première MBL de type IMP-1 a été rapportée au Japon en 1991 à partir d'une souche de *Serratia marcescens* (**Ito et al., 1995**), depuis cette découverte ces enzymes ont été observées dans le monde entier (**Queenan et Bush., 2007 ; Walsh et al., 2005**). La classe des MBL la plus communément trouvée est celle du type VIM (**Vatopoulos et al., 2008**), qui a été identifiée sur tous les continents (**Nordmann et al., 2011**). En outre, des épidémies et des rapports simples de VIM et IMP ont été signalés dans plusieurs pays comme la France (**Poirel et al., 2011 ; Lartigue et al., 2004**), l'Espagne (**Oteo et al., 2013**), le Maroc (**Barguigua et al., 2013**), l'Égypte (**Giani et al., 2012 ; Poirel et al., 2013**), et la Tunisie (**Ktari et al., 2006**).

En Algérie le premier rapport du gène VIM-4 a été caractérisé en 2010 à l'hôpital de Bouloghine (**Benamrouche et al., 2009**), les gènes VIM-19 et VIM-4, ont été signalés à l'hôpital militaire au centre d'Alger, chez 5 souches différentes d'entérobactéries (une *Providencia stuartii*, deux *E. coli* et deux *K. pneumoniae*) (**Robin et al., 2010**), et en 2012 chez 14 souches de *P.aeruginosa* isolées au CHU d'Annaba- Algérie (**Touati et al., 2013**).

- **NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1)**, identifiée en 2008, est une nouvelle metallo- β -lactamase identifiée chez une souche de *K. pneumoniae* et une souche de *E. coli* provenant respectivement d'un prélèvement urinaire et rectal chez un patient suédois rapatrié après un séjour dans un hôpital de New Delhi (**Yong et al., 2009**). Cette enzyme a déjà une diffusion internationale avec des cas rapportés dans le monde entier (**Nordmann et al., 2011**). Des données récentes suggèrent que les Balkans et le Moyen Orient constitueraient un réservoir secondaire dans la dissémination de NDM-1 dont le rapport avec l'Inde n'est pas établi. Plusieurs épidémies ou cas sporadiques ont été décrits en milieu hospitalier ou en milieu communautaire (**Giske et al., 2012**). Un des principaux facteurs de risque pour l'acquisition de bactéries productrices de NDM-1 (en dehors de voyages dans les pays à risque) est la prescription antérieure de β -lactamines ou de fluoroquinolones. Le niveau de résistance aux carbapénèmes est là aussi variable. Cependant les plasmides porteurs du gène *bla*_{NDM-1} comportent très souvent plusieurs autres gènes de résistance ce qui conduit au final à une multirésistance voire à une toto-résistance des souches (**Nordmann et al., 2011**). Plusieurs facteurs font de cette enzyme une réelle menace sanitaire mondiale : le premier est sa présence chez de nombreuses espèces bactériennes, y compris dans l'environnement (en Inde et Pakistan notamment) ; le deuxième est la fréquence de l'acquisition de ce gène par *K. pneumoniae*, qui constitue un des principaux pathogènes nosocomiaux et *E. coli*, qui reste de loin la principale bactérie dans les infections communautaires et dont le réservoir intestinal pourrait permettre une dissémination très inquiétante ; le troisième est la taille du réservoir potentiel que constitue la population du sous -continent indien (**Nordmann et al., 2011**) (figure 5).



Figure 5. La propagation mondiale de la New Delhi métallo-β-lactamase (NDM-1) (**Rolain et al., 2010**).

➤ **Carbapénémases de classe D (oxacillinasés).** Ces derniers ont été rapportés initialement à partir des souches de *P.aeruginosa*, mais actuellement, ces enzymes ont été observé principalement chez les autres bactéries à Gram négatif y compris, les entérobactéries (**Djahmi et al., 2014**).

Récemment, des souches produisant une oxacillinasé similaire, OXA-181, ont été isolées en Inde ou chez des patients d'origine indienne (**Castanheira et al., 2011**).

OXA-48 est principalement retrouvée chez *K. pneumoniae* et *E. coli*, même si d'autres espèces d'entérobactéries peuvent produire ce type d'enzyme. Les carbapénémases de classe D hydrolysent plus faiblement les carbapénèmes et les céphalosporines de 3^{ème} génération, ce qui sous-estime probablement leur fréquence de diffusion chez les entérobactéries du monde entier. Toutefois, le niveau de résistance aux carbapénèmes est plus élevé lorsqu'elles sont associées à une BLSE et à un défaut de perméabilité membranaire (**Carrër et al., 2010**). La mortalité associée à ce type d'infection demeure inconnue à ce jour.

OXA- 48 représente la principale enzyme isolée autour de monde, cette enzyme a été initialement identifiée chez une *K. pneumoniae* isolée en Turquie en 2001 (**Poirel et al., 2004**). Depuis lors, les souches productrices des OXA-48 ont été largement rapporté comme sources d'infections nosocomiales dans de nombreuses parties du monde,

notamment dans les pays méditerranéens (**Carrère et al., 2008 ; Benouda et al., 2010**). Le Moyen-orient et l'Afrique du Nord sont considérés comme des réservoirs des OXA-48 (**Poirel et al., 2012**), car au dernières années, une diffusion nosocomiale des entérobactéries productrices du gène OXA-48 a été signalée dans différents hôpitaux au Maroc (**Hays et al., 2012**). Cette émergence a été exacerbé par la présence de ce gène dans la communauté (**Barguigua et al., 2012**) et dans l'environnement (**Potron et al., 2011**), suggérant que OXA-48 est endémique dans ce pays (**Hays et al., 2012**). En Algérie, ce gène a été identifié pour la première fois chez une souche de *E.coli* isolée d'un patient hospitalisé à l'hôpital militaire à Constantine (**Agabou et al., 2014**), après, à Annaba, dans une souche de *K. pneumoniae* (**Djahmi et al., 2014**), après dans : *K. pneumoniae* et *E.coli* à Constantine en 2015 et 2016 respectivement (**Cuzon et al., 2015 ; Agabou et al., 2016**).

Le gène OXA-24 a été identifié chez *A.baumannii* dans 2 hôpitaux à Tlemcen-Algérie (**Bakour et al., 2012**), le gène OXA-58 a été rapporté en 2008 dans la même wilaya chez 12 souches cliniques d'*A. baumannii* (**Drissi et al., 2010**), le gène OXA-23 a été isolé en Algérie en 2010(**Mugnier et al., 2010**) et il est actuellement considéré comme un gène d'épidémie mondiale d'*A. baumannii* (**Kempf et al., 2012**). La coexistence du gène OXA-23 avec le gène OXA-58 a été signalée en Algérie en 2012 chez 2 souches d'*A. baumannii* (**Touati et al., 2012**).

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

1-Objectifs de l'étude

Contrairement à de nombreuses régions du monde, il existe peu d'études concernant la caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques et la relation clonale des souches de *E.coli* isolées en Algérie et particulièrement aux niveaux des hôpitaux d'Annaba. Ce travail représente une étude prospective, portant sur 105 souches de *E.coli* isolées de patients externes et hospitalisés dans les centres hospitaliers universitaires (CHU) d'Annaba-Algérie. Ces établissements hospitaliers s'étendent sur cinq wilayas, à savoir Annaba, Guelma, Souk Ahras, Tébessa, et El Taref. Les CHU d'Annaba regroupent 39 services, et présentent une capacité de 1072 lits répartis comme suit: l'Hôpital Dorban (189 lits) où sont localisés les services de pneumologie, d'infectiologie, d'hématologie et le service d'ORL ; l'Hôpital Ibn Rochd (450 lits) qui regroupe les services d'urologie, de réanimation chirurgicale, de chirurgie générale et la traumatologie ; l'Hôpital Ibn Sina (243 lits) qui regroupe des services d'endocrinologie, de néphrologie, de réanimation médicale, et de cardiologie ; enfin, l'Hôpital pédiatrique de Sainte-Thérèse (95 lits) regroupant la réanimation pédiatrique et la pédiatrie. Les données de cette étude descriptive sont collectés à partir de :

La fiche de renseignement accompagnant les prélèvements bactériologiques reçus au laboratoire de Microbiologie, le registre des prélèvements du service de Microbiologie et le logiciel WHONET 5,5 pour les antibiogrammes (logiciel utilisé pour la saisie des résultats au laboratoire de Microbiologie). Les objectifs de cette étude consistaient à (i) identifier les cas possibles d'acquisition hospitalière des souches de *E.coli* résistantes aux antibiotiques isolées aux niveaux des hôpitaux de la ville d'Annaba sur une période de 14 mois (du Janvier 2012 à Février 2013). (ii) identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones, (iii) d'étudier la possibilité de transfert de cette résistance entre les bactéries et enfin, le typage moléculaire des souches de *E.coli*.

Pour cela, nous avons eu recours à diverses techniques de Biologie Moléculaire telle que la PCR, le séquençage, MLST ainsi qu'à des expériences de conjugaison bactérienne. Les examens bactériologiques ont été réalisés au sein du laboratoire central de Microbiologie de l'hôpital de Dorban. Les techniques de Biologie Moléculaire ont été menées en partenariat avec l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, UMR CNRS-6236, IRD189, IFR48, Faculté de Médecine et de pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

2- Souches bactériennes

105 souches non répétitives de *E.coli* issues de prélèvements cliniques ont été recueillies au cours d'une période de 14 mois (du Janvier 2012 au Février 2013). Les prélèvements correspondaient aux différents sites de colonisation (urine, sang, pus, prélèvement vaginal, prélèvement protégé distal, liquide céphalo-rachidien et selles), isolés essentiellement aux différents services ont été effectués selon les techniques appropriées.

Certaines données épidémiologiques comme l'âge, le sexe et l'origine de service ont été recueillies de manière prospective.

3- Ensemencement et incubation

On procède directement à une recherche des bactéries et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée au milieu Mac Conkey ou le milieu Hektoen pour l'isolement des entérobactéries.

Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

4- Isolement et purification

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont re-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures.

5- Conservation des souches

La conservation de courte durée des isolats a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C. La conservation de longue durée des souches a été réalisée par ensemencement dans le bouillon nutritif. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un volume de la suspension obtenue a été transféré dans des tubes Eppendorf, à l'aide d'une pipette Pasteur avec 15 à 20% du glycérol stérile. Chaque souche doit être conservée en plusieurs copies. Les tubes ont été stockés au congélateur à -20°C.

6- Identification des souches

L'identification des isolats a été réalisée par la galerie API 20E (Bio-Mérieux, France) puis confirmée par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF, *time-of-flight mass spectrometry*). (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Seng et al., 2010).

6.1- API 20E (BioMérieux, Meylan, France)

➤ Principe

L'identification a été faite par la galerie rapide API système (Analytical profil index).

API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E (Biomérieux) sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension de la bactérie à tester (**Richard., 1994**).

➤ Technique

On réunie fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublier d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

➤ Lecture

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation.

6.2- La spectrométrie de masse MALDI-TOF(Microflex). *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time –Of Flight Mass Spectrometry*

➤ **Principe**

Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse (**Seng et al., 2010**).

Un spectromètre de masse comporte toujours (Figure 6) :

- une source d'ionisation : passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules
- un analyseur : séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z)
- un détecteur : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres



Figure 6. Étapes de la spectrométrie de masse (**Suarez., 2013**).

La spectrométrie de masse MALDI TOF, s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolées sur des milieux de culture solides par l'analyse de leurs protéines totales (**Claydon et al., 1996**).

➤ **Technique**

Le protocole appliqué pour identifier les 105 isolats de *E.coli* provenant de l'hôpital Dorban d'Annaba est le suivant:

- **Nettoyage de la cible (plaque métallique)**

Matériel

- Hotte chimique
- Pipette réglable
- Eprouvette graduée
- Papier de précision (type Kim Wipes)
- Ethanol 70%
- Trifluoroacetic acid TFA 80%
- Eau HPLC

Méthode

- Rincer la cible sous l'eau chaude du robinet en frottant avec du papier de précision afin de ne pas la rayer,
- Rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision,
- Répéter les deux premières étapes,
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou céramique et la recouvrir d'éthanol 70%,
- Laisser agir pendant 15 minutes puis éliminer l'éthanol dans la poubelle appropriée,
- Déposer sur la cible 500 µl de TFA 80 %, frotter avec du papier de précision,
- Rincer la cible avec de l'eau HPLC et laisser sécher 15 minutes.

- **Préparation de la matrice**

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

Matériel

- Hotte chimique
- Bain à ultrasons
- Centrifugeuse
- Réactifs : Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA), Acétonitrile, (TFA à 10%).

Méthode

- Dans un tube à Eppendorf, mettre 2g de HCCA
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile

- Ajouter 250 µl de TFA à 10%
- Ajouter 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer 10 min (la solution doit être trouble)
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Transférer le surnageant dans un tube propre, la matrice est prête à être utilisée.

- **Dépôt des échantillons**

Matériel

- Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- Cône fin
- Cible (plaque métallique)
- Matrice

Méthode

- Compléter le plan de la cible MALDI utilisée en indiquant la référence des échantillons déposés
- Déposer les échantillons dans la zone appropriée en prélevant les isolats à identifier à partir d'une colonie bactérienne de 24 heures de façon la plus homogène possible et de façon à obtenir une fine couche sur la cible (support métalliques en acier inoxydable avec 96 puits) à l'aide d'une pointe de cône. Pour chaque isolat, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.
- Déposer 1.5µl de matrice sur chaque spot.
- Laisser sécher pendant 5 min sous la hotte pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

- **Insertion de la cible et lancement du spectromètre de masse**

- Introduire la plaque (la cible) dans le Microflex.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.
- Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

➤ **Lecture et interprétation des résultats**

Le système proposé par Bruker daltonics est composé d'un appareil et du logiciel Biotyper 2.0. Ce logiciel mesure les protéines très abondantes qui se trouvent chez les micro-organismes, pour les identifier. Les données des spectres sont analysées en prenant en compte

la position, la fréquence des pics et leur intensité. Ils sont ensuite comparés à une base de données issue de répétitions spectrales de souches de référence. Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est généré et utilisé pour le classement des résultats.

Un score entre 2,33 et 3 est considéré comme une très probable identification d'espèce, entre 2 et 2,32 comme une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce entre 1,7 et 1,999 comme une probable identification de genre, requérant d'autres tests. Les scores inférieurs à 1,699 ne permettent pas d'identification et l'échantillon doit donc être repassé ou soumis à d'autres tests.

7- Antibiogramme selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM/EUCAST)

Un antibiogramme standard utilisant 20 antibiotiques a été réalisé selon les recommandations de la société française CA-SFM/EUCAST ([http : // www.eucast.org](http://www.eucast.org)) afin de déterminer la sensibilité ou la résistance des différentes souches cliniques.

➤ Principe

La méthode utilisée est celle de la diffusion en milieu solide, qui consiste à déposer des disques d'antibiotiques à la surface de la gélose coulée en boîtes de Pétri, etensemencée avec la bactérie à étudier. Ces disques sont chargés d'une quantité d'antibiotique déterminée de telle sorte que les concentrations diffusant dans la gélose correspondent aux taux sériques obtenus avec les doses usuelles. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose et y détermine des gradients de concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation les boîtes seront examinées.

➤ Technique

• Préparation de l'inoculum

Les antibiogrammes ont été réalisés sur gélose Mueller-Hinton (Sigma, France) par la méthode de diffusion en gélose.

A partir d'une culture visible du prélèvement, réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité de l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland ce qui correspond à un inoculum d'environ 2×10^8 UFC/ml. Pour ce faire, prélever plusieurs colonies de même morphologie milieu salé avec une anse stérile ou un écouvillon en coton.

- **Inoculation de la gélose**

L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.

Ecouvillonner la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemencement rotatif.

- **Dépôt des disques**

Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide la liste des antibiotiques utilisée dans cette étude est montrée dans le tableau 3.

- **Incubation des boîtes de Pétri**

Retourner les boîtes et les incuber idéalement dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques sans dépasser 30 min. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 18-24 h.

➤ **Lecture**

Un inoculum et un ensemencement corrects doivent conduire à une culture confluyente car la présence de colonies isolées indique que l'inoculum est trop faible, il faut refaire le test.

- **Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique**

Mesurer les zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.

Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux tableaux ou figurent des concentrations critiques.

Classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R)

-Remarque : la souche de contrôle de qualité *E.coli* ATCC (<http://www.atcc.org>) sensible à tous les antibiotiques a été utilisée dans les mêmes conditions que les autres souches pour apprécier la performance globale du test.

Tableau 3. Antibiotiques testés.

Antibiotiques	Abréviations	charge (µg)	Familles	
Ampicilline	AMP	30	Aminopénicillines	β-lactamines
Ticarcilline	TIC	75	Carboxypénicillines	
Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	30+10	Aminopénicillines+ inhibiteur de β-lactamase	
Céfazoline	CZ	30	Céphalosporine de 1ière génération	
Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporine de 2ème génération	
Céfotaxime	CTX	30	Céphalosporine de 3ème génération	
Aztréoname	ATM	30	Monobactames	
Imipénème	IMP	10	Carbapénèmes	
Gentamycine	GN	10	Aminosides	
Kanamycine	K	30		
Amikacine	AN	30		
Tobramycine	TM	10		
Acide nalidixique	NA	30	Quinolones	
Pefloxcine	PEF	5		
Ciprofloxacine	CIP	5		
triméthoprim-sulfaméthoxazole	SXT	1,25+23,75	Sulfamides	
Colistine	Cs	50	Polymyxine	
Furane	Ft	300	Nitrofurane	
Chloramphénicol	C	30	Phénicoles	
Fosfomycine	FOS	50	acides phosphoniques	

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

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) mesure la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens et elle évalue leurs capacité de croissance en présence d'antibiotiques à des concentrations différentes. Cela permet aux microbiologistes de déterminer quelle concentration d'antibiotique sera efficace contre un pathogène (Soussy., 2010).

➤ Principe

Le principe de l'E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bandelette de plastique inerte et non poreuse de 5 mm de large et 60 mm de long. Un côté de ce support présente une échelle de lecture de CMI en

µg/ml avec un code à deux lettres identifiant l'antibiotique. La bandelette est calibrée par un gradient pré établi de concentration d'antibiotiques couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml ou 0,064 à 1024 µg/ml selon les antibiotiques (microcsb.net/IMG/pdf/cmi_e_test.pdf).

➤ **Technique**

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. La suspension a été calibrée à l'échelle 0.5 Mac Farland. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Mueller Hinton. Lorsqu'une bandelette E.test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose. Un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en µg/ml.

Remarque : cette détermination des CMI a été pratiquée chez 3 souches de *E.coli* (Ec 37, Ec 40 ; Ec70) présentant une résistance à l'imipénème, en utilisant les antibiotiques suivants : Cefotaxime (CT), ceftriaxone (TX), ceftazidime (CAZ), imipénème (IP) amikacine (AK), ciprofloxacine (CI), colistine (CO).

➤ **Lecture de la valeur de la CMI**

Un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support. Après l'incubation, qui rend la croissance bactérienne visible, une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en µg/ml.

9- Recherche phénotypique de la production des BLSE

Après l'antibiogramme, en cas de réduction de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE ont été mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivantes :

9.1- Test de synergie

➤ Principe:

Le test de synergie permet la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) et un monobactam (aztréonam). Cette image dite en "bouchon de champagne" (**Jarlier et al. 1988**).

➤ Technique

La recherche de β -lactamase à spectre étendue a été réalisé dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 μ g) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, CRO 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 30 mm sur les boîtes de Pétri (figure 7).

Incubation pendant 18 heures à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Remarque : Toutes les souches de *E.coli* étudiées (105 souches) ont été soumises à cette technique.

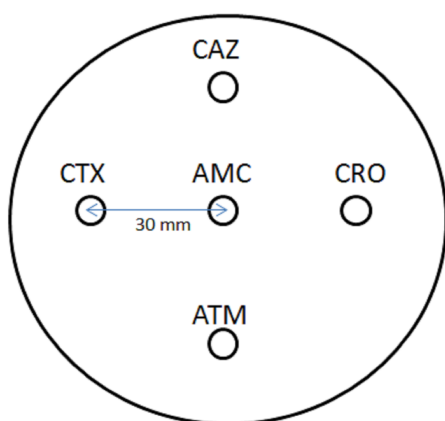


Figure 7. Schéma explicatif du dépôt des disques d'antibiotiques.

CTX : cefotaxime, CRO : ceftriaxone, ATM : aztréoname, CAZ : ceftazidime,
AMC : amoxicilline-acide clavulanique.

➤ **Lecture**

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie dite en bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

9.2- Test du double disque (appelé aussi test espagnol)

➤ **Principe**

En absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre au tour des disques C3G ou de monobactam, on recherchera donc une BLSE devant un diamètre aux valeurs suivantes : CTX= 27mm, CAZ=22mm, ATM=27mm.

Dans ce cas il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE.

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (**Rahal et al. 2005**).

➤ **Technique**

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm centre à centre selon la figure 8. On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G).

On incube pendant 18 h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Remarque : Ce test a été pratiqué chez 5 souches de *E.coli*.

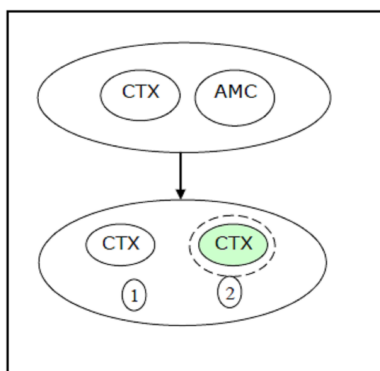


Figure 8. Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (**Rahal et al. 2005**).

➤ **Lecture**

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de troisième génération appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3ème génération.

9.3- Test à la cloxacilline

➤ **Principe**

Le test à la cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée. La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les céphalosporinases hyperproduite (**Drieux et al., 2008 ; Philippon et Arlet., 2006**).

Si un tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité de β -lactamases et apparition de l'image de synergie en « bouchon de champagne » recherchée.

➤ **Technique**

On procède de la même manière que la technique de l'antibiogramme sauf que le milieu gélosé de Muller Hinton utilisé dans cette technique est mélangé avec une concentration de cloxacilline 0,25 mg/ml, pour cela il faut dissoudre 25 mg de cloxacilline dans 10ml d'eau distillée ; puis 2 ml de cette concentration est mélangé avec 18 ml du milieu Mueller-Hinton.

Remarque : ce test a été pratiqué chez 20 souches de *E.coli*.

10- Recherche phénotypique des carbapénèmases

La recherche des carbapénèmases par les tests phénotypiques a été réalisée suite aux résultats de l'antibiogramme, Où nous avons noté une résistance très élevée à l'imipénème chez 3 souches de *E.coli* (Ec 37, Ec 40, Ec 70).

10.1- Test de Hodge

➤ Principe

Ce test phénotypique est initialement mis au point pour permettre la détection de pénicillinases, est largement utilisé pour la détection des carbapénémases.

➤ technique

Ce test consiste à ensemencer en culture confluyente (à l'aide d'un écouvillon) une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ d'une suspension de Densité Optique (DO) = 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur une gélose MacConkey. Ensuite, un disque d'imipénème chargé à 10 µg est déposé au centre de la boîte et chaque souche testée est ensemencée de manière radiale à partir du disque jusqu'au bord de la boîte de Pétri.

➤ lecture

La présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif après incubation pendant 18 h à 37°C (Anderson et al., 2007 ; Giske et al., 2011).

10.2- Test de synergie EDTA-IMP : Détection des metallo-β-lactamases (MβL)

En ce qui concerne les souches productrices des metallo-β-lactamases (MβL) comme les enzymes des familles VIM, IMP et NDM, on peut mettre en évidence la production en utilisant la propriété d'inhibition par l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) (Miriagou et al., 2010).

➤ Principe

La recherche de la métallo-bêta-lactamase a été effectué sur 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème en mettant à profit la faculté de l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'imipénème en chélatant les ions du zinc, indispensable à l'activité de la MβL en la rendant inactive.

Dans notre travail nous avons utilisé deux méthodes du test de synergie à l'EDTA double disque (DDST):

➤ **Technique1**

- Sur une gélose de Mueller-hinton, sur laquelle a été ensemencé par écouvillonnage un inoculum d'opacité 0,5 Mc Farland de la souche résistante. Un disque d'imipénème (10µg) est déposé à deux centimètres centre à centre d'un disque vierge auquel on ajoute 10µl d'une solution stérile d'EDTA 0,5 M; Après incubation à 37°C pendant 24heures.

➤ **Lecture**

si on observe une synergie entre les deux disques, on considère que ces souches sont productrices de MBL.

➤ **Technique2**

- Dans la même boîte de gélose ensemencée, on dépose deux disques d'imipénème à deux centimètres d'intervalle auxquels on rajoute à l'un d'eux 5µl d'EDTA (solution 0.5M, pH 8). Les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

➤ **Lecture**

Si les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM–EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul d'au moins 6mm, elles sont considérées comme souches productrices de MBL (**Yong et al., 2002**).

11- Test d'imipénèmase par MALDI TOF ultraflex

➤ **Principe**

Ce test correspond à la recherche d'une modification du spectre d'un carbapénème sous l'effet d'une carbapénèmase. Il s'agit d'une application de la technique de spectrométrie de masse (**MALDI-TOF**) qui est basée sur la détection après mise en contact pendant quelques heures (en général 2-3h) de la souche à tester avec une solution de carbapénème, de la disparition du pic correspondant au carbapénème testé et de l'apparition d'un pic correspondant au(x) produit(s) d'hydrolyse de ce même carbapénème (**Kempf et al., 2012**).

Le protocole utilisé pour la détection des carbapénémase par **MALDI TOF ultraflex** est le suivant :

➤ **Technique**

- **Nettoyage de la plaque – cible**

Le protocole utilisé pour le nettoyage de la cible consiste à mettre la cible dans un bain d'isopropanol à 50% et de soniquer pendant 15 min, rincer avec de l'eau HPLC et laisser sécher à l'air libre.

- **Préparation de la matrice**

- Sous une hotte chimique, dans un tube à Eppendorf, mettre 10 mg de HCCA
- Ajouter 1 ml d'acétone
- Soniquer 2 min (la solution doit être trouble)
- Enlever 660 µl et ajouter 660 µl d'éthanol
- Ajouter 1 µl de TFA.

La matrice est prête à être utilisée

- **Préparation des échantillons**

Déposer une colonie bactérienne de 24 heures, dans une solution d'imipénème (Tienam, 500 mg, MSD, Paris, France) diluée dans 0,45% NaCl et incuber à 37°C pendant 4 heures. Après l'incubation, centrifuger le mélange et utiliser le surnageant.

Sur une cible (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne; MTP AnchorChip™ 384 Cible TF), déposer 1 µl de surnageant (Echantillon à analyser) puis ajouter 1 µl de matrice et laisser sécher à température ambiante.

Remarque : sur chaque cible on dépose deux souches de référence, utilisées comme témoins : « *E.coli* ATCC 25922 » (sensible à tous les antibiotiques) comme témoin négatif, et *Klebsiella pneumoniae* « *Kpnasey* » résistante à l'imipénème comme témoin positif (**Kempf et al., 2012**).

Après séchage, la cible est introduite dans un spectromètre de masse Ultraflex (Bruker Daltonics).

➤ **Lecture**

Les résultats ultraflex traduisant la présence ou l'absence des pics représentant l'imipénème et son métabolite naturel sont analysés à l'aide d'un logiciel Flex Control.

Les résultats sont interprétés comme positifs à la production des carbapénémase, si le pic spécifique de l'imipénème à 300 m/z disparaît complètement au cours de la période d'incubation de 4 heures, avec une visualisation du pic spécifique du métabolite à 254 m/z.

On confirme la production d'une carbapénémase par le calcul du Ratio (**Kempf et al., 2012**).

$\text{Ratio} = \frac{\text{aire sous la courbe du pic de l'imipénème}}{\text{son métabolite}} < 0.5$

12-Recherche moléculaire des β -lactamases

Au cours de notre travail, on a recherché l'identification des β -lactamases de classe A, classe B, classe C d'Ambler. La recherche moléculaire des gènes codant pour ces enzymes de résistance, est basée sur l'utilisation de l'ADN pure des souches à étudier pour cela nous avons suivi le protocole suivant :

- **Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN total des 105 souches de *E.coli* a été réalisée à l'aide de l'automate **EZ1 BioRobot** de QIAGEN. La technique des particules magnétiques est utile pour une utilisation directe d'amplification ou autres applications enzymatiques tout en donnant à l'ADN une haute qualité.

Le rendement dépend de la souche bactérienne, de la densité, du volume d'échantillon et du volume d'élution. L'extraction dure 15 minutes et elle comporte 4 étapes : lyse, fixation, lavage et élution. Le tampon et la protéinase K garantissent la digestion des protéines et l'inactivation des nucléases. Quand cette étape est terminée, l'acide nucléique est capturé par les particules magnétiques qui vont être lavées à plusieurs reprises. Lors de l'élution, l'éluat se détache des billes et celle-ci sont capturées par un système qui les retient.

➤ Le protocole d'extraction suivi est le suivant :

- Mettre 190 μ l de Tampon G2 dans des tubes carrés.
- Ajouter 10 μ l de la protéinase K.
- Ajouter quelques colonies bactériennes.
- Bien vortexer.

- Mettre au bain sec à 70° pendant 10 min ou 56° C toute une nuit.
- Placer les tubes et les instruments nécessaires dans l'appareil EZ1 et insérer la carte *EZ1 DNA Bacteria* dans l'automate.
- Après avoir appuyé sur *START*, suivre les instructions de l'appareil, choisir le programme avec 50 µl de volume d'élution.

12.1- Recherche moléculaire des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des carbapénémases

12.1.1- Polymerase Chain Réaction (PCR) en temps réel

➤ Principe

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence émise par une sonde TaqMan. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle (figure 9). Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique (**Diene et al., 2011**).

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée) (figure 9).
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite (figure 9).
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle (figure 9).

➤ **Technique**

Le protocole utilisé dans ce travail est le suivant : dans une plaque pour Thermocycleur **Stratagème MX 3000P**, on dépose 20 µl du mélange réactionnel (décrit dans le tableau 4 ci-dessous) dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur. A chaque réaction de PCR nous avons utilisé un ADN d'une souche produisant le gène à tester comme témoin positif dont le programme d'amplification est illustré dans le tableau 5.

Dans notre travail, la PCR en temps réel a été utilisée uniquement pour les 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème pour le dépistage des gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{kpc}, *bla*_{oxa-48} et *bla*_{NDM-1} en utilisant des amorces et des sondes spécifiques (tableau 6).

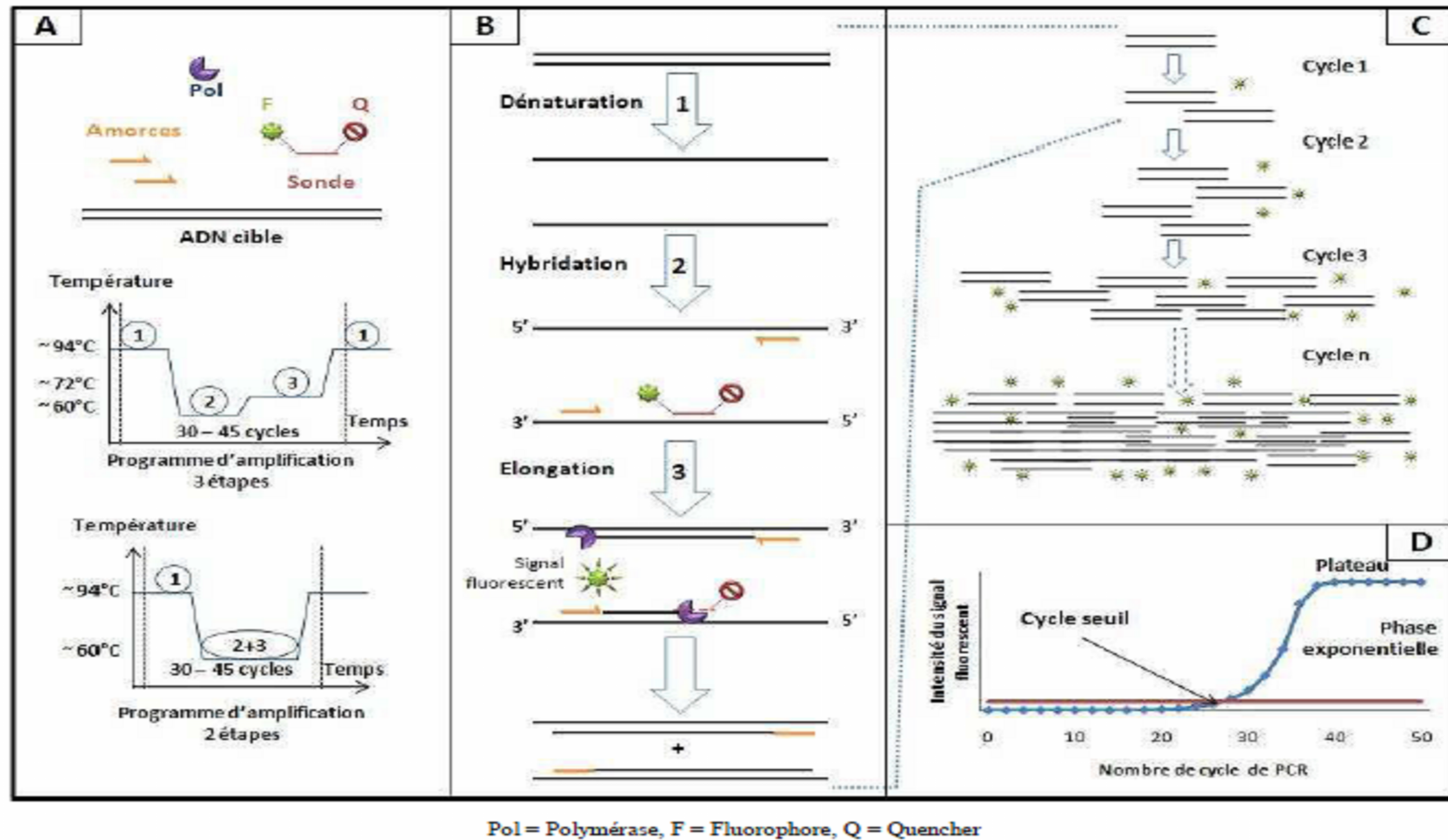


Figure 9. Principe de la PCR en temps réel (exemple des sondes TaqMan®). (<http://www.rbmc.qc.ca/reviews/>)

Tableau 4. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR et en temps réel.

Composants	Quantité PCR en temps réel
Quantitect Probe PCR Master Mix	10 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
Sonde	0.5 µl
ADN à amplifier	5 µl
H2O UP	3,5 µl
Volume total	20 µl

Tableau 5. Programme de l'amplification de la PCR en temps réel.

Température	50°C	95°C	95°C	60°C	45°C	4°C
Temps	2 min	15 min	1sec	35 sec	30sec	∞

Tableau 6. Amorces utilisées pour les PCR en temps réel

Gène	Nom de l'amorce	Séquences des amorces	Taille de l'amplicon	Références
<i>bla</i>_{CTX-M}	CTX-M-F	CGGGCRATGGCGCARAC	105 pb	(Roschanski et al., 2014)
	CTX-M-R	TGCRCCGGTSGTATTGCC		
	CTX-M-probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC		
<i>bla</i>_{TEM}	TEM-F	TTCTGCTATGTGGTGCGTA	213 pb	Cette étude
	TEM-R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA		
	TEM-probe	AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA		
<i>bla</i>_{SHV}	SHV-F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	105 pb	(Roschanski et al., 2014)
	SHV -R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT		
	SHV -probe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG		
<i>bla</i>_{kpc}	KPC-F	GATACCACGTTCCGTCTGGA	180 pb	Cette étude
	KPC -R	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC		
	KPC -M-probe	6-FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA		
<i>bla</i>_{oxa-48}	OXA-48-F	TCTTAAACGGGCGAACCAAG	125 pb	Cette étude
	OXA-48-R	GCGTCTGTCCATCCCCTTA		
	OXA-48-probe	6-FAM AGCTTGATCGCCCTCGATTTGG-TAMRA		
<i>bla</i>_{NDM-1}	NDM-1-F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	155pb	Cette étude
	NDM-1-R	CAGCCACCAAAAGCGATGTC		
	NDM-1-probe	FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA		

pb: paire de base ; F: *Forward* ; R: *Reverse* ; Ref : Référence.

12.1.2- Polymérase Chain Réaction(PCR) standard

Les réactions d'amplification des gènes codant pour les β -lactamases ont été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques illustrés dans le tableau 8. A chaque réaction de PCR standard nous avons utilisé un ADN d'une souche produisant le gène à tester comme témoin positif.

La PCR Standard a été utilisée pour l'identification des β -lactamases de classe A et B d'Ambler ; *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}.

➤ Principe

La technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR permet d'amplifier en un nombre élevé de copies une séquence particulière d'ADN. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier, l'ADN polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier. Des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces sont alors hybridées aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5'--> 3' est ensuite assurée par l'ADN polymérase Taq. Les nouvelles molécules d'ADN ainsi formées sont dénaturées et un nouveau cycle peut commencer, la réaction se répétant ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de fois (**Bonnet et al., 2000 ; Hennequin et al., 2012**).

➤ Matériel

- Plaque de PCR
- Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cyclers Tc9600-G 1002066)
- Mélange réactionnel (Tableau 7).

Tableau 7. Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standards

Composants	Quantité PCR standard
Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen	12.5 µl
Amorce Forward	0.5 µl
Amorce Reverse	0.5 µl
ADN à amplifier	5 µl
H2O UP	6.5 µl
Volume total	25 µl

➤ **Méthode**

Après avoir préparé la quantité suffisante du mélange réactionnel (décrit dans le tableau ci-dessus) pour l'amplification des échantillons, 25 µl de ce mélange sont mis dans chaque puits de la plaque pour thermocycleur. La plaque contenant le mélange réactionnel est introduite dans le thermocycleur. L'amplification PCR standard comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 1 min à 94°C (dénaturations), 50 secondes à 55°C (appariement des amorces, température variable selon le T_m des amorces) et 1 min 30 secondes à 72°C (élongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Une étape finale de 7 min à 72°C permet de terminer la synthèse des brins inachevés. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés. Les séquences sont comparées à celles déposées dans une banque de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Tableau 8. Amorces utilisées pour les PCR standard et le séquençage

Gène	Nom de l'amorce	Séquence	Taille de l'amplicon (bp)	Référence
<i>bla</i>TEM	TEM F TEM R	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	840	(Diene et al., 2011)
<i>bla</i>CTX	CTX F CTX R	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544	(Birkett et al., 2007)
<i>bla</i>SHV	SHV F SHV R	TTTATGGCGTTACCTTTGACC ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	1051	(Yagi et al., 2000)
<i>bla</i>PER	PER F PER R	GTAGTATCAGCCCAATCCCC CCAATAAAGGCCGTCCATCA	738	(Melano et al., 2003)
<i>bla</i>VEB	VEB F VEB R	GGAACAACCTTTGACGATTGA CCCTGTTTTATGAGCAACAA	374	(Melano et al., 2003)
<i>bla</i>GES	GES F GES R	GAAAAAGCAGCTCAGATCG CAACAACCCAATCTTTAGGA	597	(Melano et al., 2003)
<i>aadA</i>	aadA F aadA R	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA TTGTACGGCTCCGCAGTG	812	(Belbel et al., 2014)
<i>armA</i>	armA F armA R	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG TCTCTTCCATTCCCTTCTCC	590	Kim et al., 2008)
<i>rmtA</i>	rmtA F rmtA R	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	634	Kim et al., 2008)
<i>qnrA</i>	qnrA F qnrA R	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	543	(Touati et al., 2008)
<i>qnrB</i>	qnrB F qnrB R	GACAGAAACAGGTTACCGGT CAAGACGTTCCAGGAGCAACG	469	(Touati et al., 2008)

F : *Forward* (directe), R : *Reverse* (inverse)

12.1.2.1- Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA) à 0,5%. La migration se fait pendant 25 minutes sous un voltage de 135V.

➤ Technique de préparation du gel d'agarose

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la solution de bromure d'éthidium BET diluée (12.5 µl pour 50 ml gel d'agarose chauffé) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification du gel.

➤ Electrophorèse des produits d'amplification

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE X0.5 (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-Paire Ladder (Gibco- BRL, 15 628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4 µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du *Blue Juice*
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 25 min).
- Une fois la migration finie, Placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

➤ **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le poids moléculaire du gène et celle du témoin positif.

12.1.2.2- Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifiée, en utilisant le kit Big Dye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur. Cette technique est une PCR abortive au cours de laquelle sont introduits des acides nucléiques modifiés (ddNTP) dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation ; les quatre bases sont marquées par un fluorochrome différent. La taille des fragments abortifs obtenue est déterminée à l'aide d'un séquenceur de leurs tailles comme une électrophorèse classique, mais il présente l'avantage d'être couplé à une caméra qui détecte, en temps réel, le fluorochrome fixé à la dernière base incorporée. L'étude de succession des acides nucléiques marqués permet l'obtention de la séquence du fragment d'ADN étudié. Une PCR Big Dye est réalisée en utilisant le protocole décrit dans le tableau 12. Les produits de cette réaction sont ensuite purifiés en utilisant du Sephadex. Cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTP libres en excès qui sont de bas poids moléculaires sur une colonne Sephadex. Les produits purifiés sont séquencés en utilisant le séquenceur Automate ABI 3730.

Les séquences sont ensuite analysées avec le logiciel Codon Code Aligner. La séquence ainsi corrigée est comparée par BlastN avec la banque de donnée Genbank, NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- **Purification**

Matériel

- Plaque à filtre
- Eau Ultra-pure (UP)
- Pompe sous vide
- Agitateur secoueur de microplaques (Heidolph)

Méthode

- Dans une plaque à filtre, mettre le produit de PCR (PCR Standard) + 175 µl d'eau Ultra-pure (UP).
- Filtration sous vide (20 min).
- Ajouter 50µl d'eau UP.
- Agiter 20 min

- **PCR BigDye**

Matériel

- Plaque pour Thermocycleur
- Thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cycler)
- Mélange réactionnel (Tableau 9)

Tableau 9. Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.

Composants	Quantité PCR Big Dye
Buffer	3 µl
Mix BigDay	2 µl
Amorce	1 µl
ADN à amplifier	4 µl
H2O	10 µl
Volume total	20 µl

Méthode

Cette PCR consiste à amplifier le *Forward* et le *Reverse* séparément pour les séquencer par la suite. Une fois le mélange réactionnel est préparé (Tableau 9), un volume de 20µl est mis dans chaque puits de la plaque puis introduit dans le thermocycleur. L'amplification pour la PCR BigDye est programmée en 25 cycles comme suit : (Tableau 10).

Tableau 10. Programme de l'amplification de la PCR BigDye.

Température	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Temps	5 min	10 s	5 s	3 min	∞

- **Purification par Sephadex**

Matériel

- Plaque à filtre
- Plaque pour séquençage
- La poudre Sephadex
- Eau Ultra-pure (UP)
- Centrifugeuse

Méthode

- Mettre la poudre Sephadex dans la plaque à filtre + 300µl d'eau UP et laisser 2 à 3 heures.
- Mettre une plaque en dessous de la plaque à filtre pour récupérer l'eau après centrifugation. (L'eau est jetée par la suite).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2min à 10°C.
- Mettre le produit de la PCR Big Dye dans la plaque à filtre + une plaque en dessous pour récupérer le produit centrifugé (plaque pour séquençage).
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 2min à 10°C.
- Récupérer le produit centrifugé destiné à séquencer.

- **Méthode du séquençage**

- Remplir les fiches pour séquençage
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le support).
- Mettre la plaque dans le séquenceur Automate ABI 3730
- Lancer le séquençage.

12.1.2.3- Analyse des séquences ADN

La correction et l'analyse des séquences brutes obtenues ont été faites par le logiciel codon code aligner.

Comparer les séquences *via* internet avec les séquences homologues retrouvées dans la banque informatique internationale « GenBank » en utilisant soit le BLASTN (séquence nucléotidique) qui compare les bases azotées de l'ADN ou le BLASTP (séquence protéique) qui compare les acides aminés de la protéine traduite. Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de similarité de la souche à étudier avec les espèces les plus proches pour déterminer leur affiliation génétique.

Après le BLAST on peut construire des arbres phylogéniques des gènes étudiés à l'aide du logiciel MEGA 5 selon la méthode du « *Neighbor-joining* »

13- Recherche moléculaire de la résistance associée (aminoside, quinolone)

Cette recherche a été faite uniquement pour les 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème. Nous nous sommes intéressés particulièrement à ces souches car elles présentent des résistances qui posent un énorme problème dans la guérison et la survie des patients.

Toutes les amorces utilisées dans la PCR standard et leurs références sont montrées dans le tableau 8.

- **Résistance aux aminosides**

Plusieurs gènes codant pour les enzymes modificateuses des aminosides ont été amplifiés par PCR standard : les nucléotidyltransférases *aadA*, D'autres gènes qui codent pour les 16S ARNr méthyltransférases ont été amplifiés par PCR standard: *armA*, *rmtA*.

- **Résistance aux quinolones**

La résistance aux quinolones est analysée en amplifiant les gènes *qnrA* et *qnrB*.

14- Transfert des plasmides par conjugaison

La conjugaison est une méthode utilisée par les bactéries afin de s'échanger des informations génétiques. Elle représente le phénomène de contact physique par lequel les plasmides peuvent passer d'une cellule donatrice à une autre réceptrice. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques: l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

Le transfert entre les organismes donneurs et accepteurs de plasmide se fait en quatre grandes étapes (**Touati, 2006**) :

- Reconnaissance entre donneur (F+) et accepteur (F-) grâce au pilli
- Transfert d'un des deux brins du plasmide
- Synthèse du brin complémentaire chez l'accepteur
- Recirculation du plasmide chez l'accepteur

Les expériences de conjugaison ont été réalisées dans le but de montrer la nature plasmidique des supports des gènes de résistance aux antibiotiques et leur transférabilité.

Nous avons pris les 3 souches de *E.coli* qui portent les gènes (CTX-M-15, TEM-1, NDM-5 et *aadA2*) pour confirmer la notion du co-transfert des gènes de BLSE et du gène de résistance aux aminosides. Ces souches ont été utilisées dans notre étude comme donneurs putatifs dans la technique de conjugaison en bouillon et comme souche réceptrice nous avons utilisé *E.coli* J53 (appelée aussi F- ou Azi R) est une dérivée de *E. coli* K-12 qui est résistante seulement à l'azide (l'azoture de sodium) et sensible à tous les antibiotiques.

Les transconjugants ont été sélectionnés sur gélose de Lauria Bertani (LB) additionnée de l'azide de sodium (100µg/ml) et de l'imipénème (2µg/ml).

Matériel

- Antibiotiques : imipénème en poudre
- Azide en poudre
- Eau distillée
- Bouillon TSB
- LB agar
- autoclave
- Pipettes graduées

- Balance à précision
- Matériel nécessaire pour antibiogramme et CMI (E.Test)
- Matériel nécessaire pour PCR standard et séquençage
- Souche *E.coli* J53

Méthode

Jour 1 (J1)

Ensemencer la souche *E.coli* J53 réceptrice et les souches *E.coli* J5 donatrices en milieu Mac Conkey et incubé 24 heures à 37°C pour avoir des cultures jeunes le lendemain.

J2

- Ensemencer la souche réceptrice et les souches de *E.coli* donatrices en bouillon TSB et incubé 4 heures à 37°C (pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne) avec agitation.
- Après l'incubation, réaliser un mélange donatrices réceptrices dans un rapport 1/10 (1ml de bactéries donatrices+ 9ml de bactéries réceptrices) à fin d'optimiser le contact.
- mélanger doucement 2 à 3 fois
- incubé 18 à 24 heures à 37°C sans agitation.

J3

- Préparer les boîtes des milieux sélectifs en incorporant à une gélose LB l'azide et l'imipénème à des concentrations finales de 100µg/ml et 2 µg/ml
- Ensemencer par épuisement le mélange sur la moitié des boîtes de sélection (figure 10).
- Vérifier la sélectivité des milieux utilisés en ensemençant par spot (ou par dépôt de 4µl à l'aide d'une micropipette) la souche donatrice et la souche réceptrice dans l'autre moitié.
- Incuber 24 heures à 37°C.

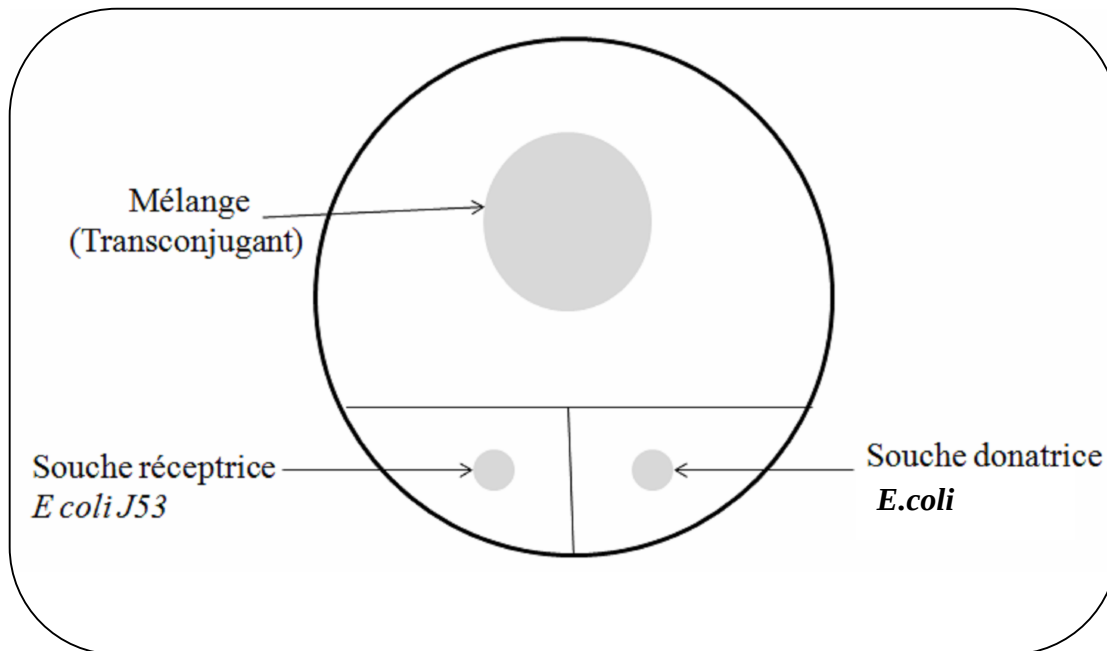


Figure 10. Schéma explicatif de la disposition des souches sur le milieu sélectif.

J4

- Après incubation, identifier la culture du transconjugant par MALDI-TOF-MS.
- Faire un antibiogramme du transconjugant et de la souche donatrice selon les recommandations de la CA-SFM/EUCAST
- Déterminer les CMI des transconjugants par E.test

J5

- Vérifier le transfert de la résistance entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice en comparant les deux antibiogrammes et les valeurs des CMI.
- Vérifier le transfert des gènes de résistance par Biologie Moléculaire en réalisant une PCR standard des gènes CTX-M, SHV, TEM, NDM et aaA2 codants pour la résistance aux β -lactamines et aux aminosides et leur séquençage.

14.1- Extraction de l'ADN plasmidique

3 souches de *E.coli* possédant un plasmide conjugatif ont fait l'objet d'une extraction plasmidique en utilisant la colonne QIAGEN provenant du QIAprep[®] Spin Miniprep Kit.

➤ **Matériels**

- Tubes Eppendorf
- Pipettes
- cultures bactérienne d'une nuit
- Buffer P1 (conservé au réfrigérateur) : est un tampon de remise en suspension utilisé pour la purification de l'ADN plasmidique.
- Buffer P2 : est une solution de lyse alcaline, elle contient du dodécylsulfate de sodium (SDS) qui permet de percer des trous dans les membranes cellulaires pour libérer l'ADN des cellules.
- Buffer N3 : est un tampon de neutralisation
- Buffer PB : est un tampon de lavage
- Buffer EB : est un tampon d'élution
- colonne spin QIAprep

➤ **Technique**

1-A partir d'une colonie fraîchement isolée sur boîte, préparer une culture de nuit en milieu LB additionnée de l'antibiotique approprié. Incuber 12 à 16h à 37° avec agitation.

2-Récupérer 1,5 ml de culture et centrifuger à au moins 8000 rmp dans une microcentrifugeuse de paillasse à température ambiante. (Pour des plasmides à moyen ou bas nombre de copies, on peut centrifuger successivement 2× 1,5 ml de culture afin d'augmenter le rendement). Eliminer la totalité du surnageant par retournement.

3-Resuspendre totalement le culot bactérien dans 250 µl de tampon P1 et transférer dans un tube Eppendorf. Vérifier au préalable que la RNase a été ajoutée au tampon P1.

4-Ajouter 350 µl de tampon P2 et mélanger délicatement en retournant le tube 4 à 6 fois. La solution doit devenir visqueuse. Ne laisser pas cette réaction de lyse se prolonger plus de 5 minutes.

Si le tampon P1 contenait du « LyseBlue », la solution doit virer au bleu après ajout de P2 et la coloration être bien homogène après le mélange.

5-Ajouter 350 µl de tampon N3 et mélanger immédiatement et vigoureusement en retournant le tube 4 à 6 fois.

Un précipité blanc nuageux doit se former.

Si le « LyseBlue » a été utilisé, mélanger jusqu'à disparition de la coloration bleue.

Une suspension homogène et incolore indique que le SDS a bien été précipité.

6-Centrifuger pendant 10 minutes à 13 000 rpm sur une centrifugeuse de plaillasse.

Un culot compact se forme au fond du tube.

7-Récupérer le surnageant et déposer le sur la colonne QIAprep. Centrifuger pendant 45 secondes. Eliminer le liquide collecté.

Cette phase de lavage permet d'éliminer les traces de nucléases.

8-Laver la colonne QIAprep en ajoutant 500 µl de tampon PB et centrifuger pendant 45 secondes. Eliminer le liquide collecté.

Cette phase de lavage permet d'éliminer les traces de nucléases.

9-Laver la colonne QIAprep en ajoutant 750 µl de tampon PE et centrifuger pendant 45 secondes.

10-Eliminer le liquide collecté et re-centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute supplémentaire pour éliminer toute trace de tampon de lavage.

Des traces d'éthanol résiduel pourraient inhiber les réactions enzymatiques réalisées ultérieurement sur l'ADN préparé.

11-déposer la colonne sur un tube Eppendorf propre de 1,5 ml. Ajouter 50 µl de tampon EB (10 Mm Tris-HCL, pH 8,5) ou d'eau qualité biologie moléculaire au centre de la colonne.

Laisser reposer 1 minute puis centrifuger 1 minute à vitesse maximale.

Eliminer la colonne et étiqueter correctement le tube contenant l'ADN extrait.

Conserver à -20° C jusqu'à l'utilisation.

L'ADN plasmidique extrait a été utilisé pour la réalisation des PCR des gènes suivants : CTX-M, TEM, NDM, aadA2.

Les produits des PCR ont été migrés sur gel d'agarose à 1% dans une cuve pour électrophorèse pendant 40 min. Après la migration, le gel a été soumis sous U.V pour la révélation.

15- Typage moléculaire des souches : *Multi-locus sequence typing* (MLST)

La méthode MLST est une classification phylogénétique qui regroupe les différentes souches en fonction de leur degré de parenté et qui permet de comprendre leur évolution. Cette méthode est basée sur la détermination des séquences nucléotidiques de plusieurs gènes de ménage (tableau 11). Les gènes de ménage sont présents dans tous les isolats d'une espèce et ont une variabilité suffisante pour former les allèles différents pour chaque souche. Les allèles de chacun des gènes séquencés sont regroupés ensemble et la souche se voit attribuer un "type de séquence" spécifique, communément appelé "*Sequence-Type*" (ST). Les isolats qui ont des "ST" identiques sont définis comme étant un même clone par MLST. L'un des avantages de la méthode MLST est qu'il existe une base de données universelle (**www.mlst.net**) dans laquelle se trouvent toutes les "*Sequence-Type*" de *E. coli* déjà identifiés. Les résultats de MLST de divers laboratoires partout au monde sont envoyés dans cette base de données pour comparer et identifier le ST. Si un ST ne se trouve pas dans cette base de données, un nouveau nom lui est attribué (**Foley et al., 2009**).

Tableau 11. Caractéristiques des 7 gènes utilisés en MLST
([http:// www .mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli](http://www.mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli)).

Locus	Fonction du gène	Séquences des amorces	Taille (pb)
<i>Adk</i>	adenylate kinase	<i>adkF</i> 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' <i>adkR</i> 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3' <i>adkF1</i> 5'-TCATCATCTGCACTTTCCGC-3' <i>adkR1</i> 5'-CCAGATCAGCGCGAACTTCA-3'	583 bp
<i>fumC</i>	fumarate hydratase	<i>fumCR1</i> 5'-TCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3' <i>fumCF</i> 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' <i>fumCR</i> 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTTC-3'	806 bp
<i>Icd</i>	isocitrate/isopropylm -alate dehydrogenase	<i>icdF</i> 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' <i>icdR</i> 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'	878 bp
<i>purA</i>	adenylosuccinate dehydrogenase	<i>purAF1</i> 5'-TCGGTAACGGTGTTGTGCTG-3' <i>purAF</i> 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' <i>purAR</i> 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	816 bp
<i>gyrB</i>	DNA gyrase	<i>gyrBF</i> 5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' <i>gyrBR1</i> 5'-GTCCATGTAGGCGTTCAGGG-3' <i>gyrBR</i> 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'	911 bp
<i>recA</i>	ATP/GTP binding motif	<i>recAR1</i> 5'-AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG-3' <i>recAF</i> 5'-CGCATTCGCTTTACCCTGACC-3' <i>recAF1</i> 5'-ACCTTTGTAGCTGTACCACG-3' <i>recAR</i> 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'	780 bp
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	<i>mdhF</i> 5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3' <i>mdhR</i> 5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-3' <i>mdhF1</i> 5'-AGCGCGTTCTGTTCAAATGC-3' <i>mdhR1</i> 5'-CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT-3'	932 bp

*pb : paire de base.

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

Nous avons mené une étude prospective descriptive de 105 souches de *E.coli* hospitalières et communautaires isolées au sein du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Dorban à Annaba du Janvier 2012 au Février 2013.

1-Identification et origine des souches de *E.coli* isolées

L'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF- MS (Microflex) des 105 souches de *E.coli* isolées a donné de très bons scores >2.0 (tableau 12) confirmant l'identification par galerie API20E (BioMérieux, Meylan, France).

Tableau 12. Provenance des 105 souches de *E.coli* isolées et leurs scores MALDI TOF- MS

Référence de la souche	Date du prélèvement	Age	Sexe	Nature du prélèvement	Service	Score élevé (MALDI-TOF)
Ec1	12/12	3 mois	F	Pus	Pédiatrie	2,163
Ec2	12/12	71 ans	M	Pus	ORL	2,19
Ec3	11/12	7 jours	M	Urine	Pédiatrie	2,31
Ec4	10/12	54 ans	F	Urine	Externe	2,308
Ec5	12/12	33 ans	F	Urine	Externe	2,403
Ec6	10/12	36 ans	M	Urine	Infectieux	2,378
Ec7	01/12	2 ans	F	Urine	Pédiatrie	2,26
Ec8	07/12	60 ans	F	Urine	Externe	2,392
Ec9	07/12	76 ans	M	Urine	Externe	2,399
Ec10	09/12	71 ans	M	Urine	Infectieux	2,387
Ec11	11/12	52 ans	F	Urine	Externe	2,283
Ec12	12/12	33 ans	M	Urine	Externe	2,459
Ec13	05/12	62 ans	F	Urine	Externe	2,336
Ec14	01/12	3 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,412

Tableau 12 (suite)

Ec15	12/11	59 ans	M	Pus	Infectieux	2,29
Ec16	02/12	56 ans	F	PV	Externe	2,261
Ec17	02/12	77 ans	M	Urine	Infectieux	2,295
Ec18	05/12	31 ans	M	PPD	R.M	2,243
Ec19	11/12	25 ans	M	Urine	néphrologie	2,115
Ec20	04/12	1 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,197
Ec21	01/12	2 ans	M	Urine	Pédiatrie	2,397
Ec22	09/12	1 mois	F	LCR	Pédiatrie	2,324
Ec23	10/12	77 ans	M	Urine	Externe	2,084
Ec24	12/12	35 ans	M	Pus	Externe	2,18
Ec25	02/12	22 jours	F	Urine	Pédiatrie	2,371
Ec26	11/12	20 jours	F	Urine	Pédiatrie	2,436
Ec27	07/12	1 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,364
Ec28	12/12	35 ans	M	Urine	Externe	2,049
Ec29	09/12	72 ans	M	Pus	endocrinologie	2,452
Ec30	11/12	15 jours	F	Pus	Pédiatrie	2,104
Ec31	11/12	2 mois	F	Pus	Pédiatrie	2,217
Ec32	06/12	67 ans	F	Urine	Infectieux	2,12
Ec33	04/12	75 ans	F	Urine	néphrologie	2,165
Ec34	04/12	60 ans	M	Urine	Externe	2,262
Ec35	12/12	63 ans	M	PV	Externe	2,223
Ec36	01/12	74 ans	M	Urine	Infectieux	2,256
Ec37	12/12	63 ans	M	Urine	Externe	2,437
Ec38	12/12	86 ans	M	Urine	Externe	2,345
Ec39	01/12	1 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,44
Ec40	12/12	75 ans	M	Urine	Externe	2,337
Ec41	02/11	69 ans	F	Urine	Externe	2,338
Ec42	10/12	45 ans	M	Urine	Externe	2,5
Ec43	11/12	66 ans	M	Urine	Externe	2,404
Ec44	01/13	85 ans	F	Urine	Externe	2,372
Ec45	06/12	15 ans	F	Urine	Pédiatrie	2,398
Ec46	12/12	70 ans	F	Urine	Externe	2,369

Tableau 12 (suite)

Ec47	08/12	2 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,295
Ec48	09/12	65 ans	M	Pus	Infectieux	2,342
Ec49	11/12	54 ans	M	Urine	Externe	2,238
Ec50	02/12	2 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,321
Ec51	03/12	32 ans	F	Sang	R.M	2,362
Ec52	03/12	1 mois	M	Sang	Pédiatrie	2,333
Ec53	1/12	77 ans	M	Pus	endocrinologie	2,369
Ec54	12/12	35 ans	F	Urine	Externe	2,325
Ec55	04/12	78 ans	F	Urine	Externe	2,426
Ec56	10/12	9 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,485
Ec57	06/12	68 ans	M	Pus	Infectieux	2,309
Ec58	12/12	1 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,208
Ec59	01/12	1 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,335
Ec60	01/12	64 ans	F	Urine	Externe	2,244
Ec61	10/12	37 ans	F	PV	Infectieux	2,314
Ec62	09/12	2 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,46
Ec63	01/13	68 ans	M	Urine	néphrologie	2,365
Ec64	01/13	88 ans	F	Urine	Externe	2,202
Ec65	02/13	72 ans	F	Urine	Infectieux	2,373
Ec66	12/12	83 ans	M	Urine	Externe	2,202
Ec67	02/12	69 ans	F	Pus	Externe	2,365
Ec68	12/12	3 mois	F	Pus	Pédiatrie	2,284
Ec69	12/12	58 ans	F	Urine	Infectieux	2,338
Ec70	11/12	5 mois	M	Sang	Pédiatrie	2,417
Ec71	02/12	74 ans	M	Urine	Infectieux	2,337
Ec72	11/12	5 mois	M	Selle	Pédiatrie	2,329
Ec73	04/12	27 ans	F	Sang	R.M	2,409
Ec74	12/12	5 mois	F	LCR	Pédiatrie	2,264
Ec75	01/13	76 ans	F	Urine	Externe	2,328
Ec76	01/13	33 ans	F	Urine	Externe	2,268
Ec77	01/13	49 ans	M	Urine	Infectieux	2,38

Tableau 12 (suite)

Ec78	12/12	2 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,289
Ec79	01/13	2 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,226
Ec80	01/13	2 mois	F	Pus	Pédiatrie	2,313
Ec81	01/13	33 ans	F	Pus	Externe	2,424
Ec82	01/13	52 ans	F	Urine	endocrinologie	2,278
Ec83	01/13	2 ans	M	Urine	Pédiatrie	2,249
Ec84	01/13	63 ans	F	Urine	Externe	2,446
Ec85	01/13	4 ans	F	Urine	Pédiatrie	2,353
Ec86	07/12	27 ans	F	Urine	Externe	2,319
Ec87	06/12	10 mois	F	Urine	Pédiatrie	2,349
Ec88	12/12	38 ans	F	Sang	Infectieux	2,334
Ec89	07/12	83 ans	M	Pus	Externe	2,308
Ec90	01/13	57 ans	F	Urine	Infectieux	2,26
Ec91	01/12	67 ans	M	Pus	ORL	2,344
Ec92	11/12	75 ans	M	Urine	Externe	2,448
Ec93	01/13	71 ans	M	Pus	ORL	2,379
Ec94	08/12	57 ans	F	Urine	Externe	2,315
Ec95	02/12	65 ans	F	Urine	Externe	2,333
Ec96	03/12	2 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,309
Ec97	04/12	23 ans	F	Pus	R.M	2,272
Ec98	07/12	3 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,317
Ec99	12/12	3 mois	F	Pus	Pédiatrie	2,281
Ec100	01/13	64 ans	M	Urine	Externe	2,371
Ec101	12/12	6 mois	M	Urine	Pédiatrie	2,351
Ec102	12/11	64 ans	M	Urine	R.M	2,336
Ec103	06/12	74 ans	M	Urine	Infectieux	2,308
Ec104	02/13	76 ans	M	Urine	Externe	2,337
Ec105	10/12	87 ans	F	Urine	Infectieux	2,31

M : masculin, F : féminin, PPD : prélèvement protégé distale, PV : prélèvement vaginal,
 LCR : Liquide Céphalo-Rachidien, ORL : Oto-Rhino-Laryngologie. R.M : réanimation
 médicale.

1.1- Répartition des souches de *E.coli* selon l'origine du produit pathologique

Le taux le plus élevé est représenté par des prélèvements urinaires 70,47% (74/105), suivi par les prélèvements des pus avec 18,09% (19/105), un taux de 4,76% (5/105) à été isolé du sang et un autre taux de 2,85% (3/105) à été isolé des prélèvements vaginaux, les liquides céphalo-rachidiens ont représenté un taux de 1,90% (2/105), les prélèvements protégés distaux et les selles ont présenté un taux de 0,95% (1/105) des prélèvements pathologiques recueillis dans ce laboratoire (figure 11).

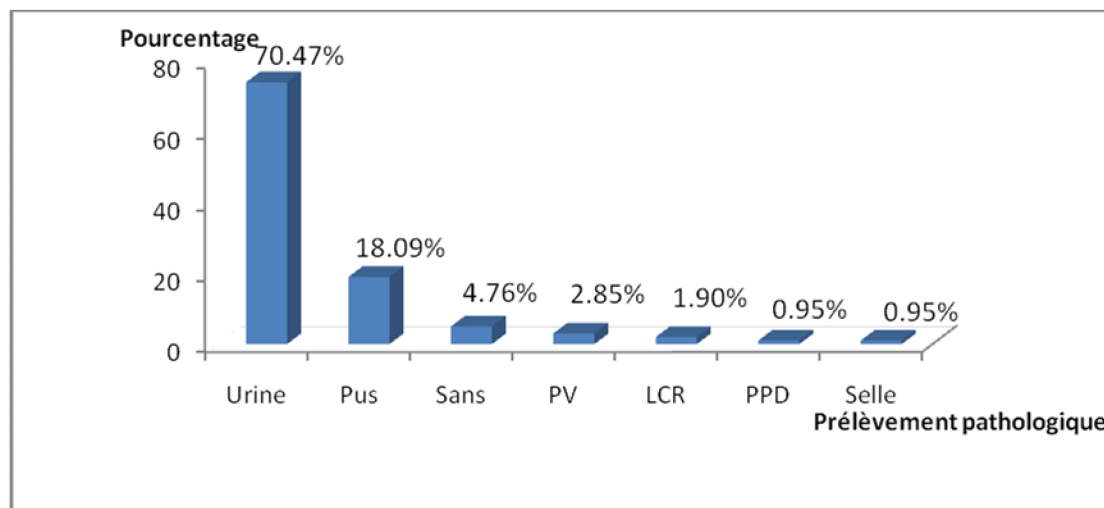


Figure 11. Répartition des souches par origine de prélèvement.

1.2-Répartition des patients infectés par l'espèce *E.coli* selon le sexe

Nos résultats montrent une prédominance des souches isolées à partir des patients du sexe féminin avec 50,47% (53/105) alors que le sexe masculin a présenté un taux de 49,52% (52/105) (figure 12).

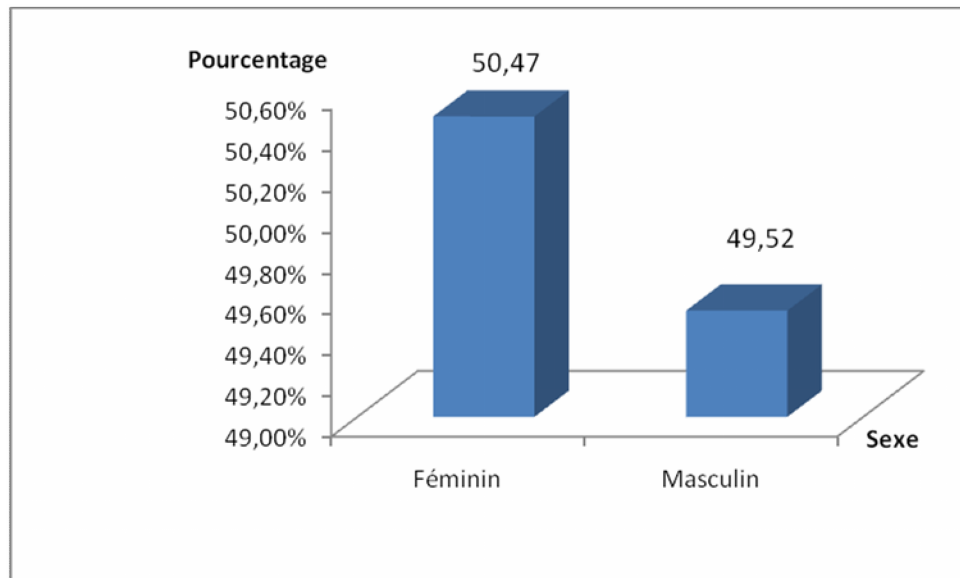


Figure 12. Répartition des patients infectés par l'espèce *E.coli* selon le sexe

1.3-Répartition des patients infectés par l'espèce *E.coli* selon l'âge

Toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections à *E.coli*, avec des extrêmes d'âge variant entre 7 jours et 88 ans. La tranche d'âge qui semble la plus touchée par les infections à *E.coli* dans notre étude est la population des personnes âgées (> 50 ans) 49,52% (52/105) suivie par la population des enfants de moins de trois ans 31,42% (33/105) (figure 13).

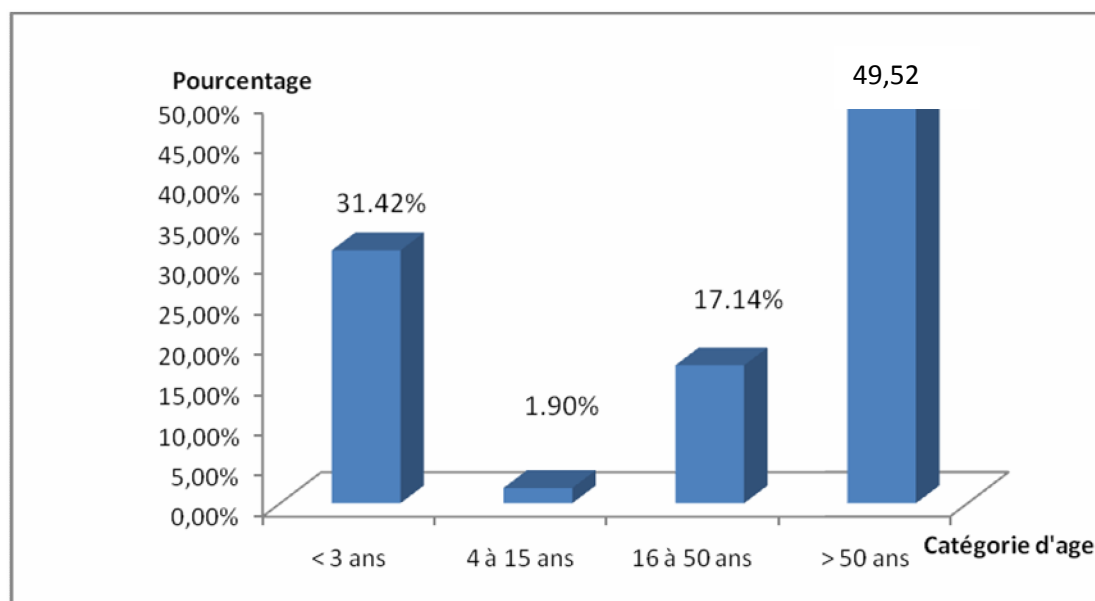


Figure 13. Répartition des patients infectés par l'espèce *E.coli* selon l'âge.

I.4- Répartition des souches selon les services d'hospitalisation

Nous avons isolé 37,14% (39/105) souches chez les patients non hospitalisés et 62,85% (66/105) chez les patients hospitalisés.

Parmi les souches isolées en milieu hospitalier, le service de pédiatrie occupe la première place avec 33,33% (35/105) des souches isolées, suivi par le service de l'infectieux avec 16,19% (17/105), la figure 14 montre les différents taux.

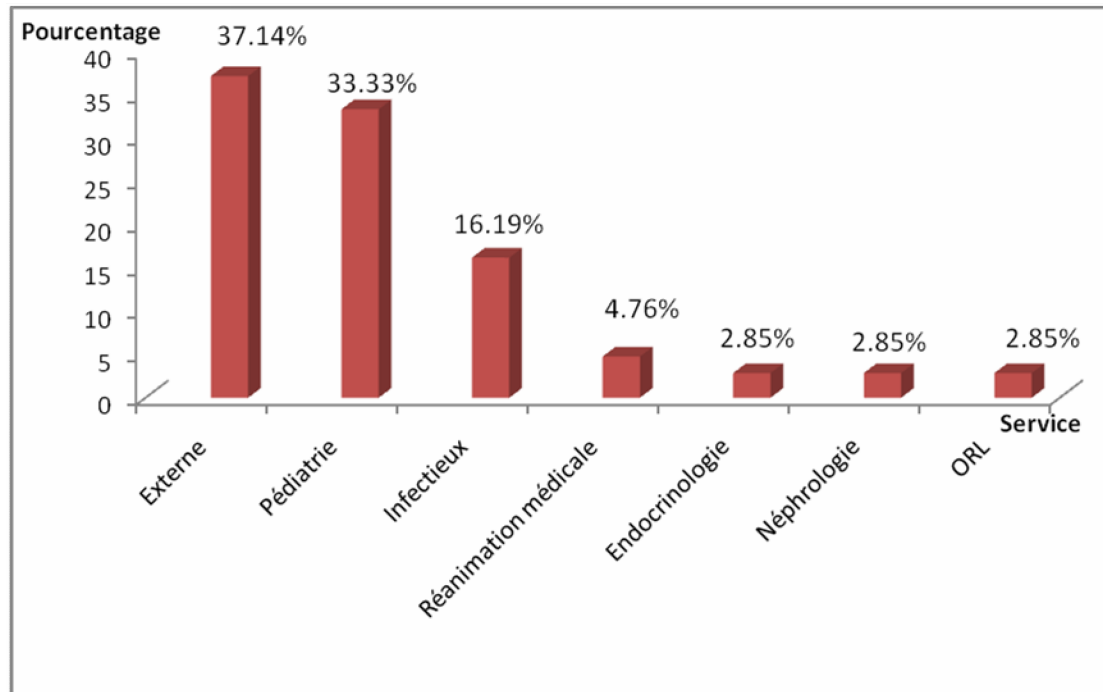


Figure 14. Répartition des souches selon les services d'hospitalisation.

2- Profil de résistance aux antibiotiques

2.1- Résistance aux β -lactamines des souches de *E.coli*

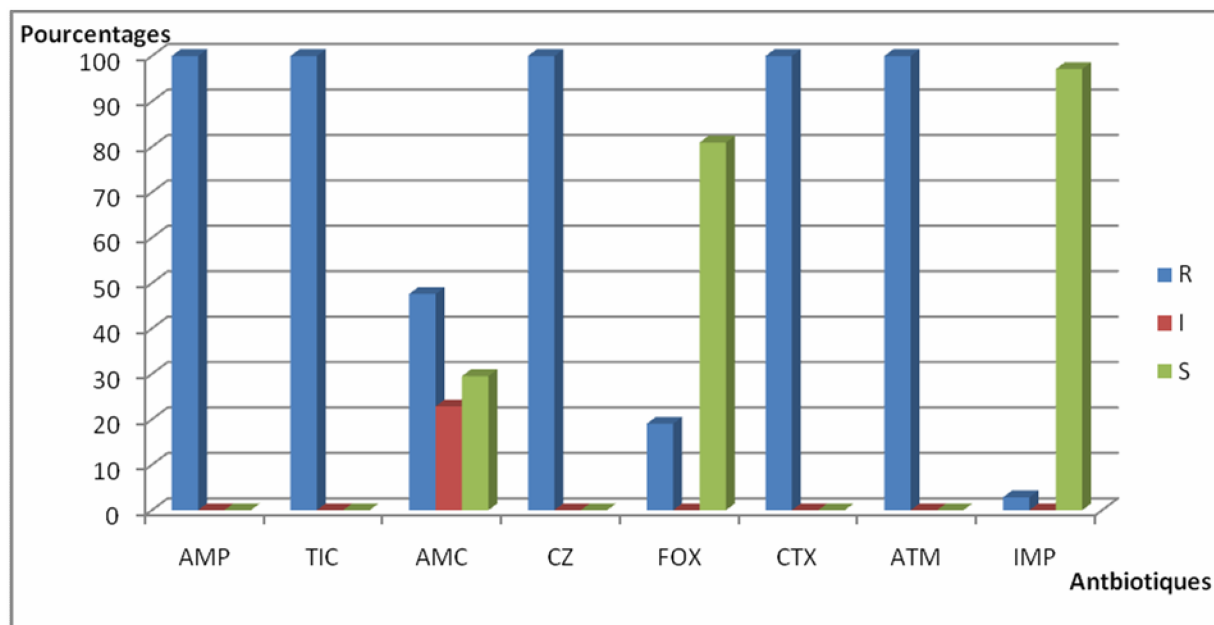
Durant la période de notre étude, le taux de résistance aux céphalosporines de 3ème génération a connu une augmentation très remarquable.

Les résultats de l'étude de la résistance des 105 souches de *E.coli* aux différents antibiotiques utilisés, montrent que toutes les souches sont 100% résistantes à l'amoxicilline, ticarcilline, céfazoline, les céphalosporines de 3ème génération et l'aztréonam (figures 15, 19).

Résultats

On a observé une résistance de 47,61% concernant l'association amoxicilline+ acide clavulanique. Par ailleurs, on assiste à une résistance de 19,04% vis-à-vis à la cefoxitine, suggérant la possible production d'une céphalosporinase plasmidique.

Nous avons signalé aussi dans ce travail, la présence de trois souches de *E.coli* (Ec 37, Ec 40, Ec 70) résistantes à l'imipénème du groupe des carbapénèmes dont le taux de résistance est de 2,85%.



R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible.

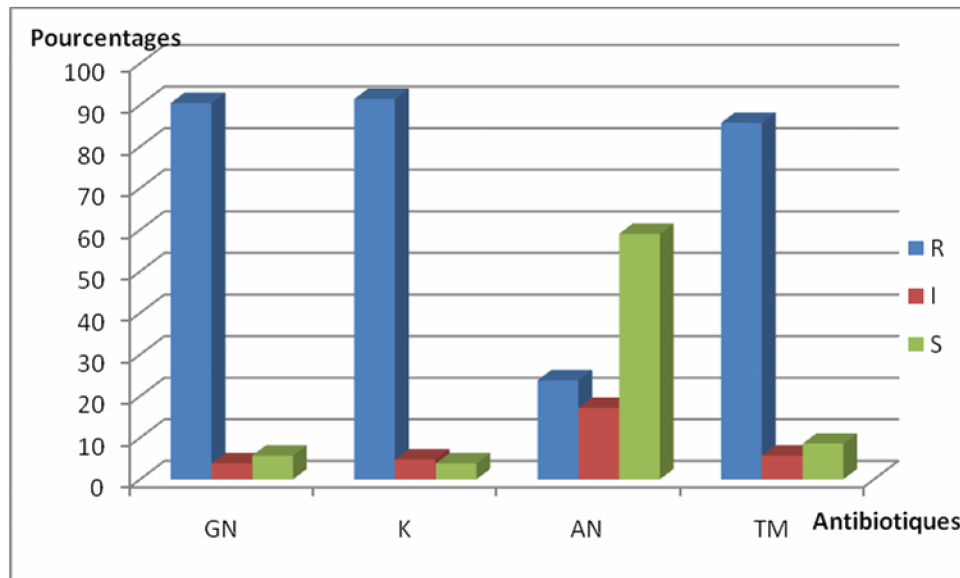
Figure 15. Résistance aux β -lactamines des 105 souches cliniques de *E.coli*.

2.2- Résistance aux aminosides

Des résistances associées aux aminosides sont retrouvées chez toutes les souches de *E.coli* étudiées, ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique.

Les souches de *E. coli* ont présenté un profil de résistance particulier aux aminosides avec une résistance assez marquée, de 85,71%, 90,47% et 91,42% respectivement pour la tobramycine, la gentamicine et la kanamycine.

En revanche l'amikacine reste plus efficace sur la majorité de souches avec un taux de résistance de 23,8%. (Figure 16).



R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible.

Figure 16. Résistance aux aminosides des 105 souches cliniques de *E.coli*.

2.3- Résistance aux quinolones

La résistance de souches de *E.coli* BLSE⁺ aux Céphalosporines de 3ème génération est associée à une résistance aux quinolones et fluoroquinolones dont on a observé une résistance de 86,66 % pour l'acide nalidixique, 61,9% pour la pefloxacin et de 74,28 % pour la ciprofloxacine (figure 17).

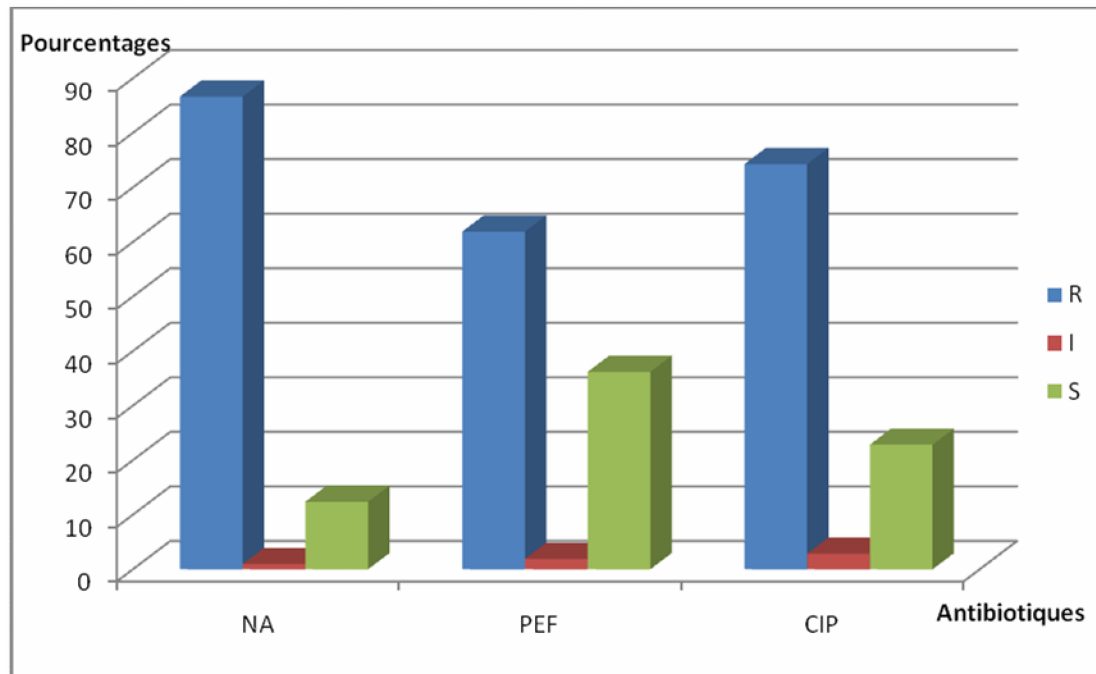


Figure 17. Résistance aux quinolones des 105 souches cliniques de *E.coli*.

2.4- Résistance aux autres antibiotiques

L'évaluation de la résistance aux autres familles d'antibiotiques a révélé aussi d'autres profils de résistance de la majorité des souches à : l'association sulfaméthoxazole + triméthoprim, le chloramphénicol, la nitrofurantoïne, et la fosfomycine dont les taux de résistances étaient respectivement 79,04%, 35,23%, 12,38%, 8,57% (figure 18).

La colistine s'est montrée l'antibiotique le plus actif sur toutes les souches testées, soit un taux de sensibilité de 100%.

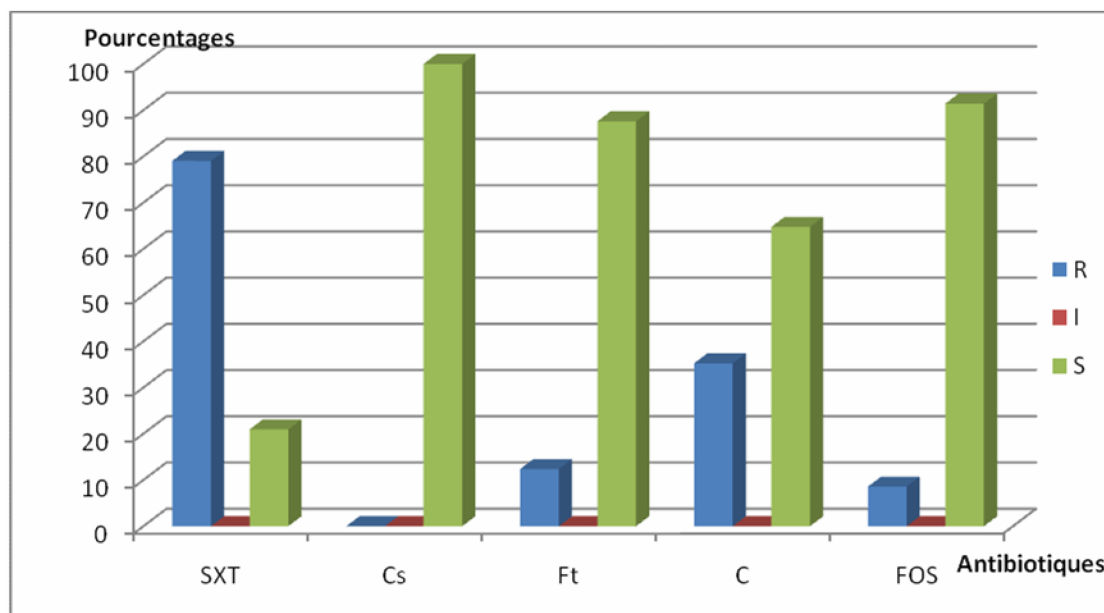


Figure 18. Résistance aux autres antibiotiques testés sur les 105 souches cliniques de *E.coli*.

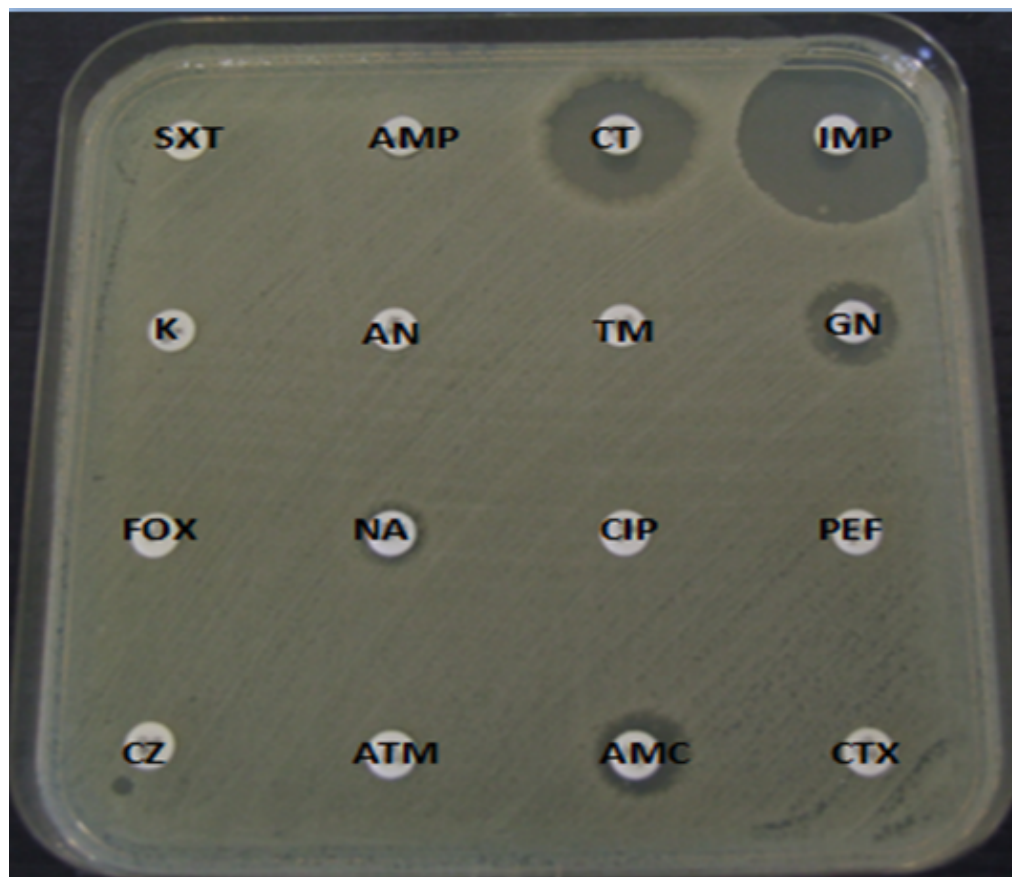


Figure 19. Antibiogramme de la souche Ec 90.

3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test

Pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices, nous nous sommes intéressés particulièrement aux 3 souches de *E.coli* (Ec 37, Ec 40, Ec 70) résistantes à l'imipénème dont les valeurs absolues des CMI à l'égard de cet antibiotique ont été $>32 \mu\text{g/ml}$ (figure 21). Ces mêmes souches ont présenté également des résistances aux aminosides et aux fluoroquinolones dont les valeurs de leurs CMI étaient $>256 \mu\text{g/ml}$ et $>32 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les 3 souches étaient sensibles à la colistine avec des CMI égales à $0,38 \mu\text{g/ml}$ (figure 20).



Figure 20. CMI par E-test des 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème.

CT : cefotaxime, TX : ceftriaxone, CAZ : ceftazidime, AK : amikacine, CI : ciprofloxacine, CO : colistine.

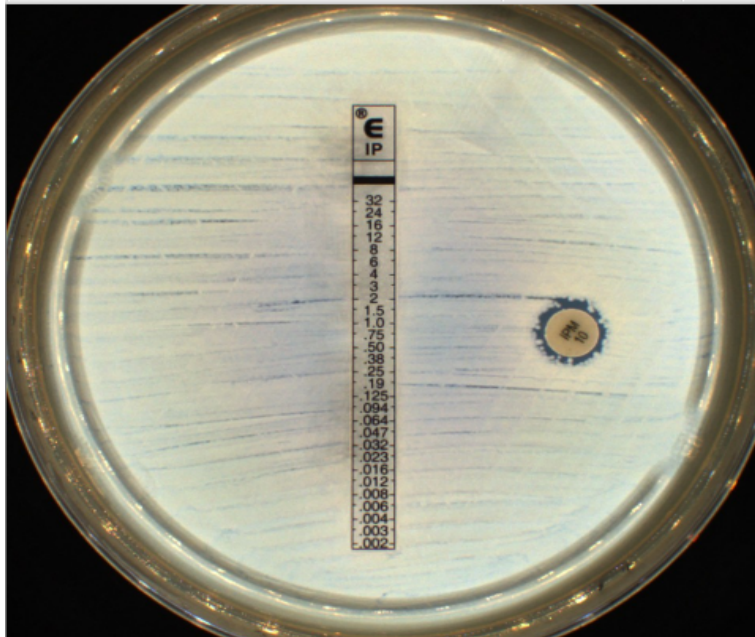


Figure 21. Concentration minimale inhibitrice par E-test de la souche Ec 37 résistante à l'imipénème.

IP : imipénème.

4- Recherche phénotypique de la production des BLSE

4.1- Test de synergie

Pour le test de synergie, la lecture des résultats a révélé la présence d'une zone d'élargissement en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » chez 80 souches de *E.coli* testées, indiquant clairement la production de BLSE (figure 22).

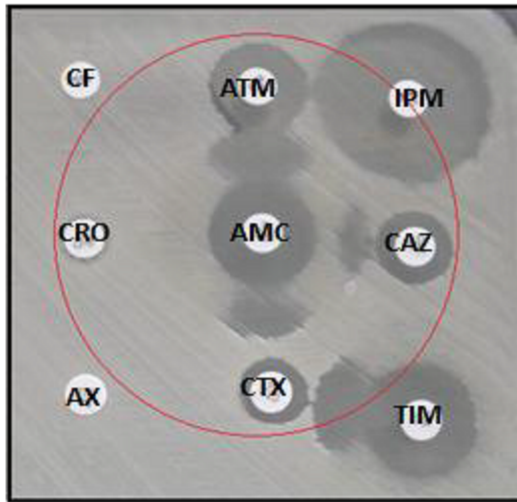


Figure 22. Images de synergie entre les C3G et l'AMC de la souche Ec1.

4.2- Double disque

Pour les souches qui n'ont pas présenté une image de synergie, nous avons pratiqué la technique du double disque pour confirmer la production d'une BLSE qui peut être masquée par un autre mécanisme de résistance. Ce test a été positif pour les 5 souches de *E.coli* testées. La figure suivante montre un double disque positif.

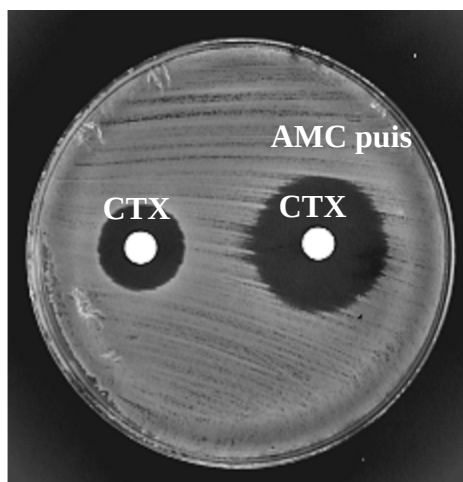


Figure 23. Ec 65 productrice de BLSE (Double disque positif).

4.3- Test de synergie sur gélose Mueller-Hinton additionné de cloxacilline

Les souches n'ayant pas présenté d'image de synergie et qui ont présenté une résistance

vis-à-vis de la céfoxitine (FOX) ont été testées une deuxième fois par addition de cloxacilline dans la gélose Mueller Hinton.

Les résultats de

ce test ont montré les cas des associations BLSE plus céphalosporinase (figures 24).



Figure 24. La souche Ec 79 productrice d'une BLSE plus céphalosporinase

Ces association BLSE plus céphalosporinase restent rares, dans notre étude 20 cas seulement ont été identifiés.

5- Recherche phénotypique des carbapénémases

5.1- Test de Hodge

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture de *E.coli* ATCC 25922 (sensible à tous les antibiotiques) indique que le test de Hodge est positif.

L'image de trèfle était bien visible avec les 3 souches de *E.coli* IMP-R testées, ce qui indique que ces dernières produisent une carbapénémase (figures 25, 26).

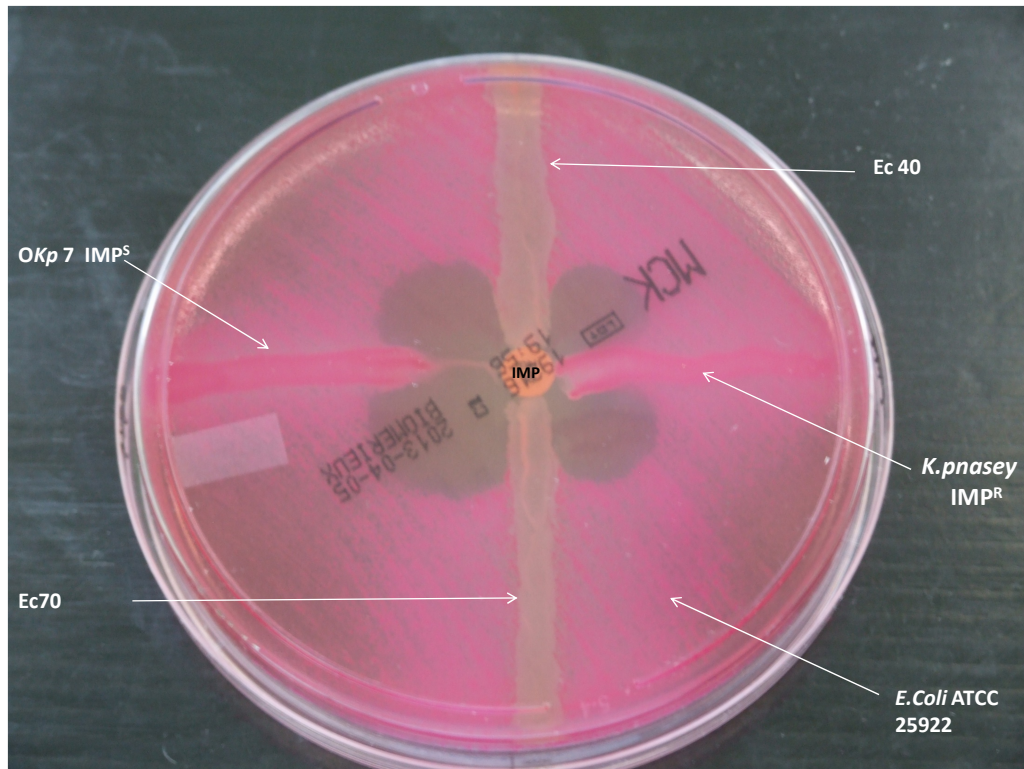


Figure 25. Test de Hodge des souches Ec 40 et Ec 70

K.pnasey IMP^R : *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème (Témoin positif).

OKp 7 IMP^S : *K. pneumoniae* sensible à l'imipénème (Témoin négatif).

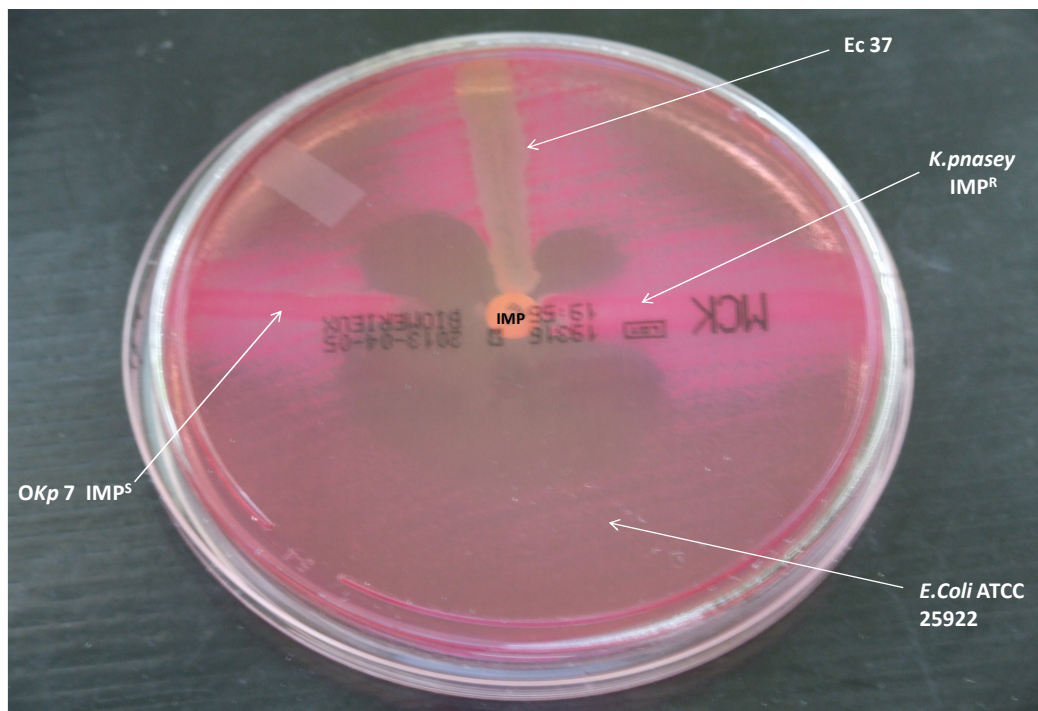


Figure 26. Test de Hodge de la souche Ec 37

K.pnasey IMP^R : *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème (Témoin positif).

OKp 7 IMP^S : *K.pneumoniae* sensible à l'imipénème (Témoin négatif).

5.2-Test à l'EDTA

Le test à l'EDTA a montré que les 03 souches de *E.coli* sont productrices de métallobactamase (métallo-carbapénémases), les figures suivantes montrent les images de synergie entre EDTA et l'imipénème.

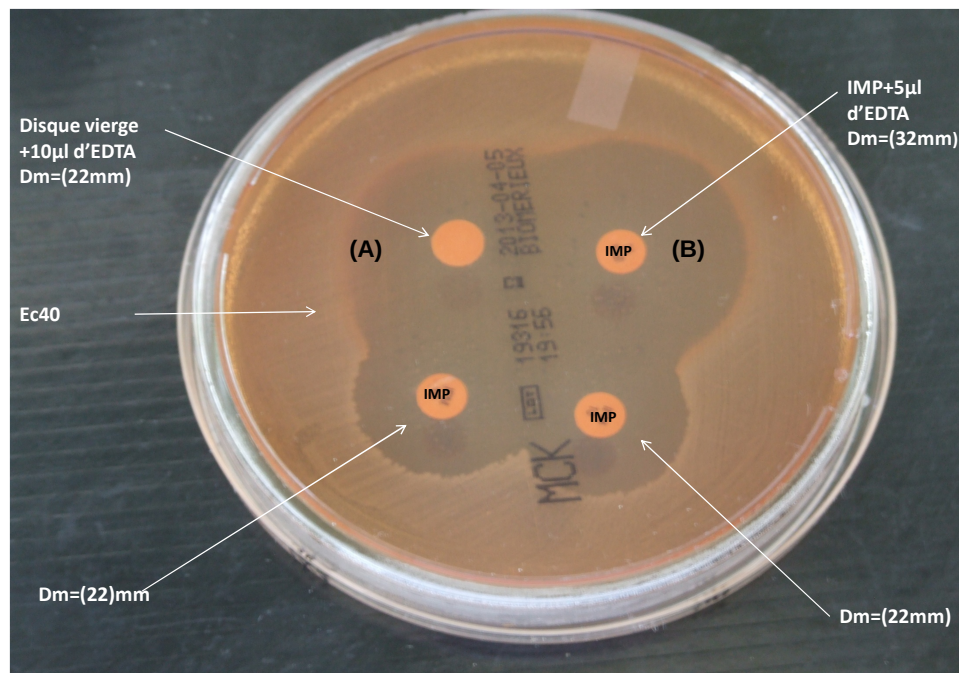


Figure 27. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 40 productrice d'une métallo-carbapénémase.

(A) Un disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA; après une incubation on remarque une synergie entre les deux disques.

(B) deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA ; après une incubation, on remarque une synergie.

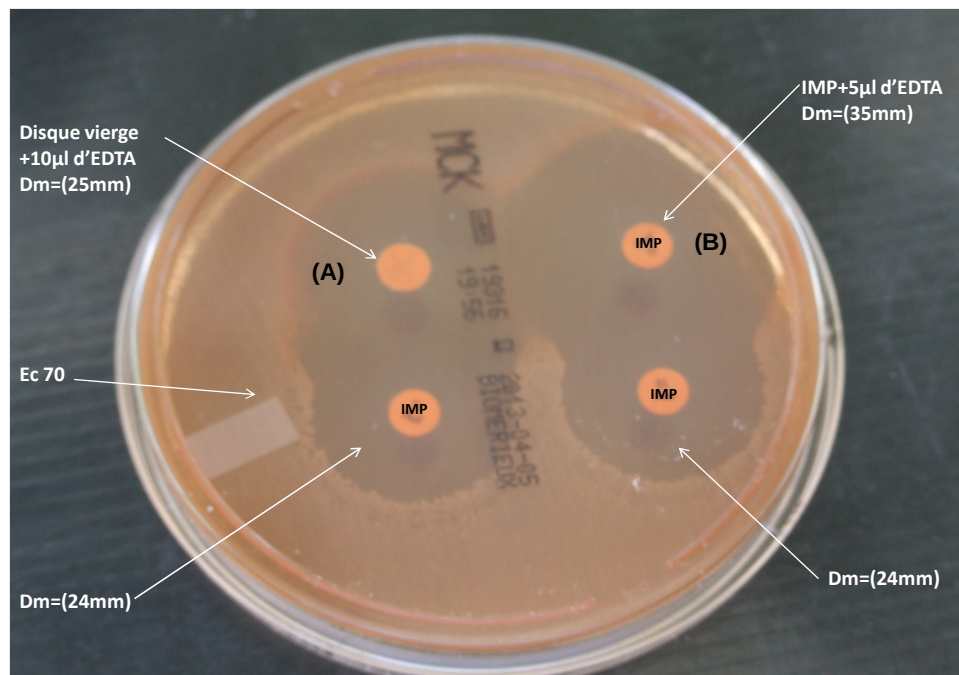


Figure 28. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 70 productrice d'une métallo-carbapénémase.

(A) Un disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA; après une incubation on remarque une synergie entre les deux disques.

(B) deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA ; après une incubation, on remarque une synergie.

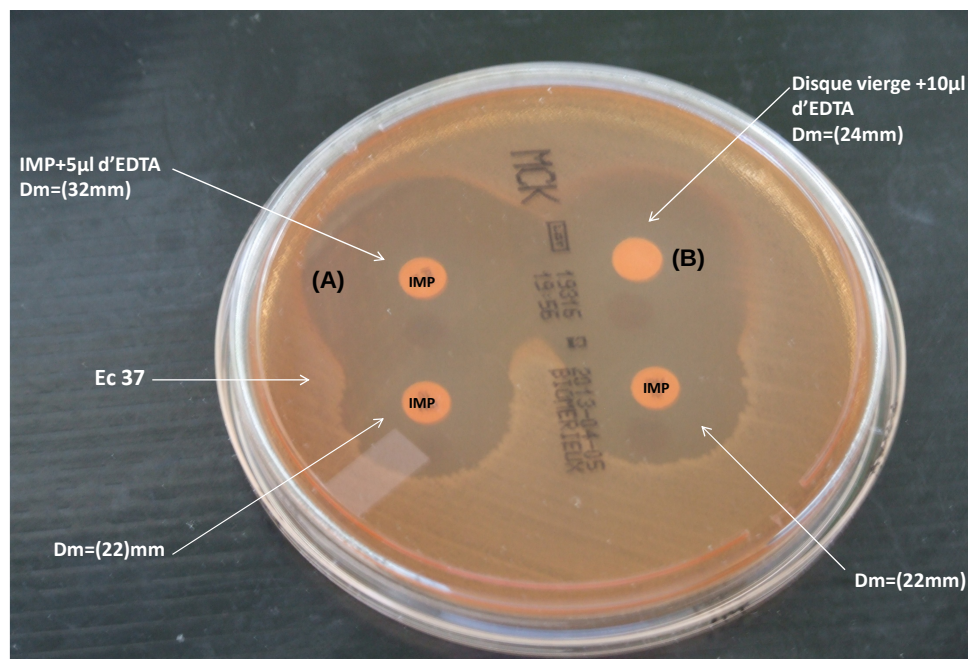


Figure 29. Test de synergie EDTA-IMP chez la souche Ec 37 productrice d'une métallo-carbapénémase.

(A) Un disque d'imipénème et un disque vierge avec de l'EDTA; après une incubation on remarque une synergie entre les deux disques.

(B) deux disques d'imipénème l'un d'eux avec de l'EDTA ; après une incubation, on remarque une synergie.

5.3-Test MALDI TOF ultraflex

Ce test a été utilisé pour la détection des carbapénémases des 3 souches de *E.coli*. Pour valider ce test deux souches de référence ont été utilisées comme témoins : *E.coli* ATCC 25922 comme témoin négatif et *Klebsiella pneumoniae* (« Kpnasey » souche de référence pour NDM-1) comme témoin positif.

Les résultats de l'ultraflex des 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème ont montré que ces souches ont dégradé complètement l'imipénème après une période d'incubation de 2 heures avec disparition du pic spécifique à cet antibiotique à 300 m/z associée à une visualisation du pic spécifique du métabolite à 254m/z. Ce résultat a été confirmé par le calcul du ratio qui a été < 0.5 (figure 30).

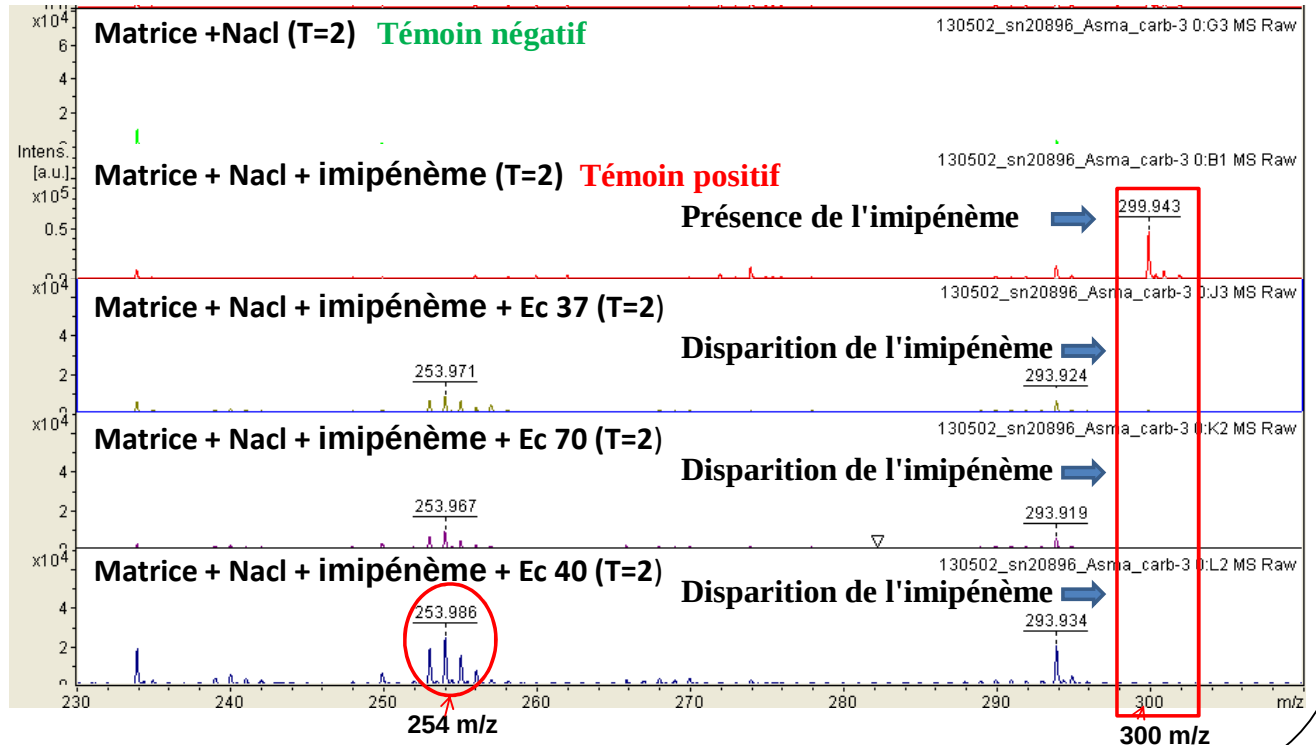


Figure 30. Hydrolyse de l'imipénème par Spectres de masse MALDI TOF Ultraflex des 3 souches de *E.coli* (Ec 37, Ec 40, Ec 70) résistantes à l'imipénème.

Après une incubation à 37°C pendant 2 heures avec une concentration d'imipénème à 0,25 mg / ml; NaCl 0,45%.

Les unités de l'axe ordonné (verticale) représentent la masse par charge en Daltons [m / z (Da)] et celles de L'axe des abscisses (horizontale) représentent une intensité relative (unités arbitraires).

6- Déduction des phénotypes de résistance aux β -lactamines

La déduction des phénotypes de résistance aux β -lactamines testés est basée sur les critères suivants :

- Résistance au CTX.
- Résistance à l'aztreonam et l'Imipénème ;
- Présence ou absence d'image de synergie sur gélose MH.

- Présence ou absence d'image de synergie sur gélose MH +cloxacilline,
- Test de Hodge et de l'EDTA.

Les phénotypes probables sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 13. Fréquences des phénotypes de résistance aux β -lactamines des 105 souches de *E.coli* étudiées.

Phénotype de résistance	Fréquence (%)
BLSE	80,95
BLSE + CHN	19,04
Carbapénèmase	2,85

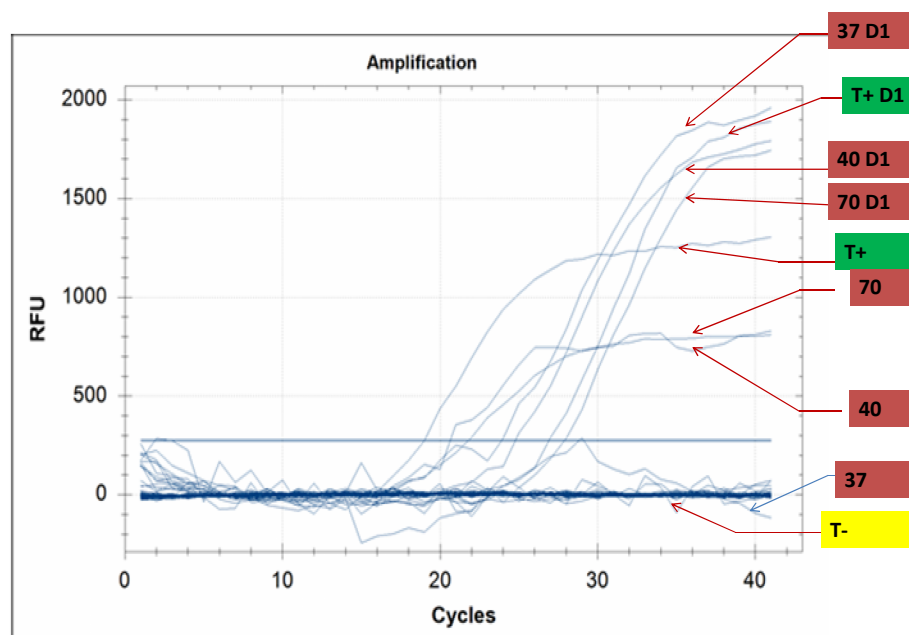
BLSE: β -lactamases à spectre étendu. CHN : céphalosporinase de haut niveau.

7- Détermination des supports génétiques de la résistance

7.1- Détection moléculaire des gènes codant pour les BLSE

7.1-1- Par PCR en temps réel

L'amplification en temps réel est une technique rapide et efficace qui nous a permis de détecter d'une part la présence des gènes *bla*_{CTX-M} et *bla*_{TEM} qui codent pour la résistance aux β -lactamines des 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème, et d'autre part d'éliminer la présence du gène *bla*_{SHV}. Les figures (31, 32, 33, 34) montrent les différentes PCR.



D1 : dilution 1/10.

Figure 31. Amplification du gène *bla*_{CTX-M} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	37	28.82	28.82	0.000
A02	FAM		Unkn	37 D1	23.91	23.91	0.000
A03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B01	FAM		Unkn	70	21.80	21.80	0.000
B02	FAM		Unkn	70D1	27.90	27.90	0.000
B03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
B08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C01	FAM		Unkn	40	20.64	20.64	0.000
C02	FAM		Unkn	40 D1	24.78	24.78	0.000
C03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D01	FAM	Pos Ctrl	T+		19.01	19.01	0.000
D02	FAM	Pos Ctrl	T+D1		26.90	26.90	0.000
D03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000

Figure 32. Nombre de cycles de l'amplification du gène *bla*_{CTX-M} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel.

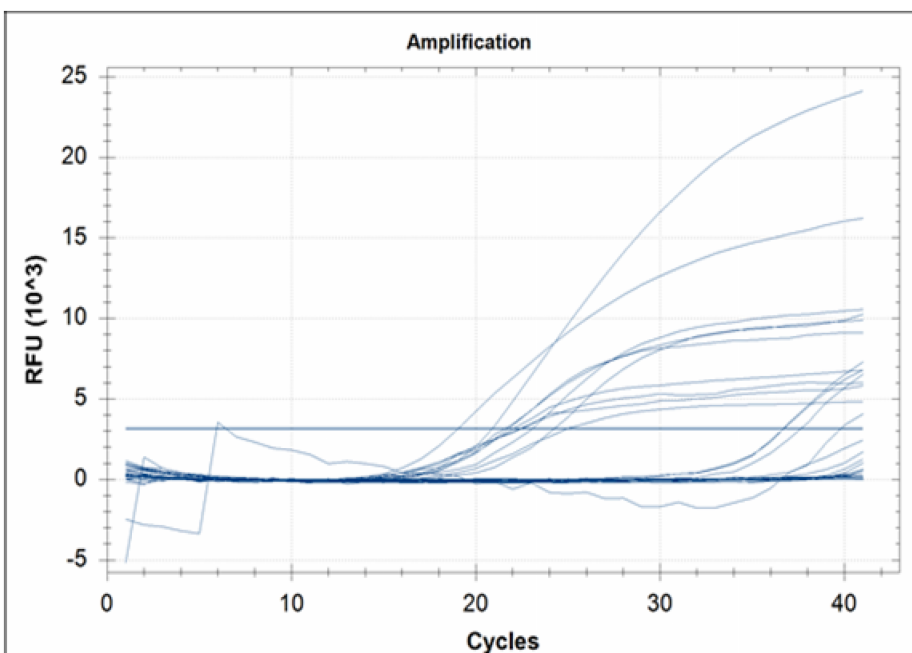


Figure 33. Amplification du gène *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	37 TEM	22.43	22.43	0.000
A02	FAM		Unkn	D1	21.57	21.57	0.000
A03	FAM		Unkn	37 SHV	N/A	0.00	0.000
A04	FAM		Unkn	D1	N/A	0.00	0.000
A05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
A12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B01	FAM		Unkn	70 TEM	24.96	24.96	0.000
B02	FAM		Unkn	D1	24.25	24.25	0.000
B03	FAM		Unkn	70 SHV	N/A	0.00	0.000
B04	FAM		Unkn	D1	N/A	0.00	0.000
B05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C01	FAM		Unkn	40 TEM	22.42	22.42	0.000
C02	FAM		Unkn	D1	21.75	21.75	0.000
C03	FAM		Unkn	40 SHV	N/A	0.00	0.000
C04	FAM		Unkn	D1	N/A	0.00	0.000
C05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D01	FAM		Pos Ctrl	T+ TEM	22.01	22.01	0.000
D02	FAM		Pos Ctrl	D1	23.07	23.07	0.000
D03	FAM		Pos Ctrl	T+ SHV	19.04	19.04	0.000
D04	FAM		Pos Ctrl	D1	20.89	20.89	0.000
D05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
E01	FAM		NTC	T-	N/A	0.00	0.000
E02	FAM		NTC	T-	N/A	0.00	0.000
E03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
E04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
E05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
E06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
E07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000

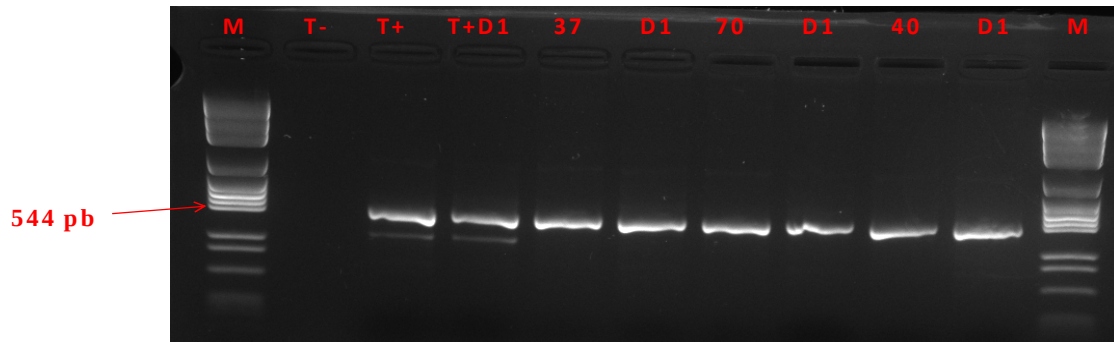
Figure 34. Nombre de cycles de l'amplification du gène *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel

7.1.2- Par PCR standard

Les résultats des PCR standards des gènes codant pour les BLSE des 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème, après une électrophorèse sur gel d'agarose ont confirmé les résultats des PCR en temps réel (figure 35 et 36), en ce qui concerne les autres souches de *E.coli* nous avons trouvé que :

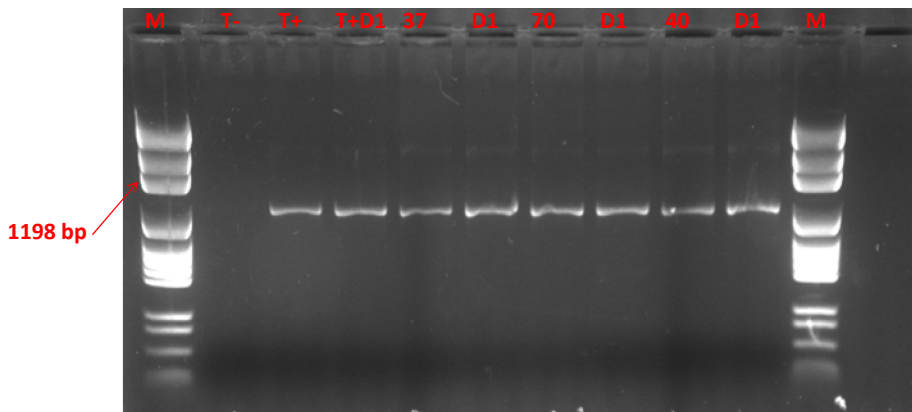
- Sur les 102 souches de *E.coli* isolées 98 (93,33%) des souches possèdent le gène *bla*_{CTX-M} (figure 36).
- 95 (90,47%) souches possèdent le gène *bla*_{TEM} (figure 38).
- 33 (31,42%) souches possèdent le gène *bla*_{SHV} (figure 39).

D'après nos résultats, nous notons qu'aucune souche ne possède les gènes : *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}.



M : Marqueur du poids moléculaire
 T+ : Témoin positif
 T- : Témoin négatif
 D1 : dilution 1/10

Figure 35. Amplification du gène *bla*_{CTX-M} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR standard.



M : Marqueur du poid moléculaire
 Pb : Paire de bases
 T+ : Témoin positif
 T- : Témoin négatif
 D1 : dilution 1/10

Figure 36. Amplification du gène *bla*_{TEM} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR standard.

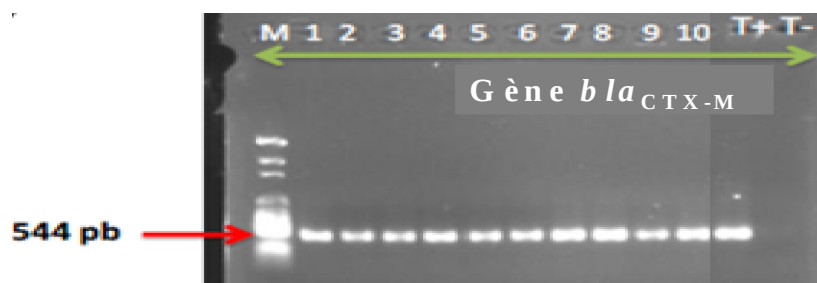


Figure 37. Amplification du gène *bla*_{CTX-M} de 10 souches de *E.coli* par PCR standard.

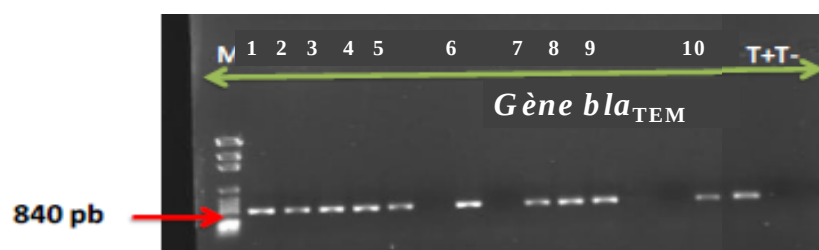


Figure 38. Amplification du gène *bla*_{TEM} de 10 souches de *E.coli* par PCR standard.



Figure 39. Amplification du gène *bla_{SHV}* de 10 souches de *E.coli* par PCR standard.

7.2- Détection moléculaire des gènes codant pour des carbapénémases

Les résultats de la PCR en temps réel et la PCR standard ont montré que les 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème possèdent le gène *bla_{NDM}* de type métallo- β -lactamase ce qui confirme le résultat de synergie EDTA-IMP (Figure 40, 41 et 42).

Aucune souche ne possède les gènes *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{oxa-48}*.

Les trois souches de *E.coli* ont été toutes isolées en 2012. Ec 37, Ec 40 ont été récupérées à partir des urines de deux patients externes de sexe masculin, âgés respectivement de 63 ans et 75 ans. En revanche, la souche Ec 70 a été trouvée dans le sang d'un nourrisson de sexe masculin, âgé de 5 mois.

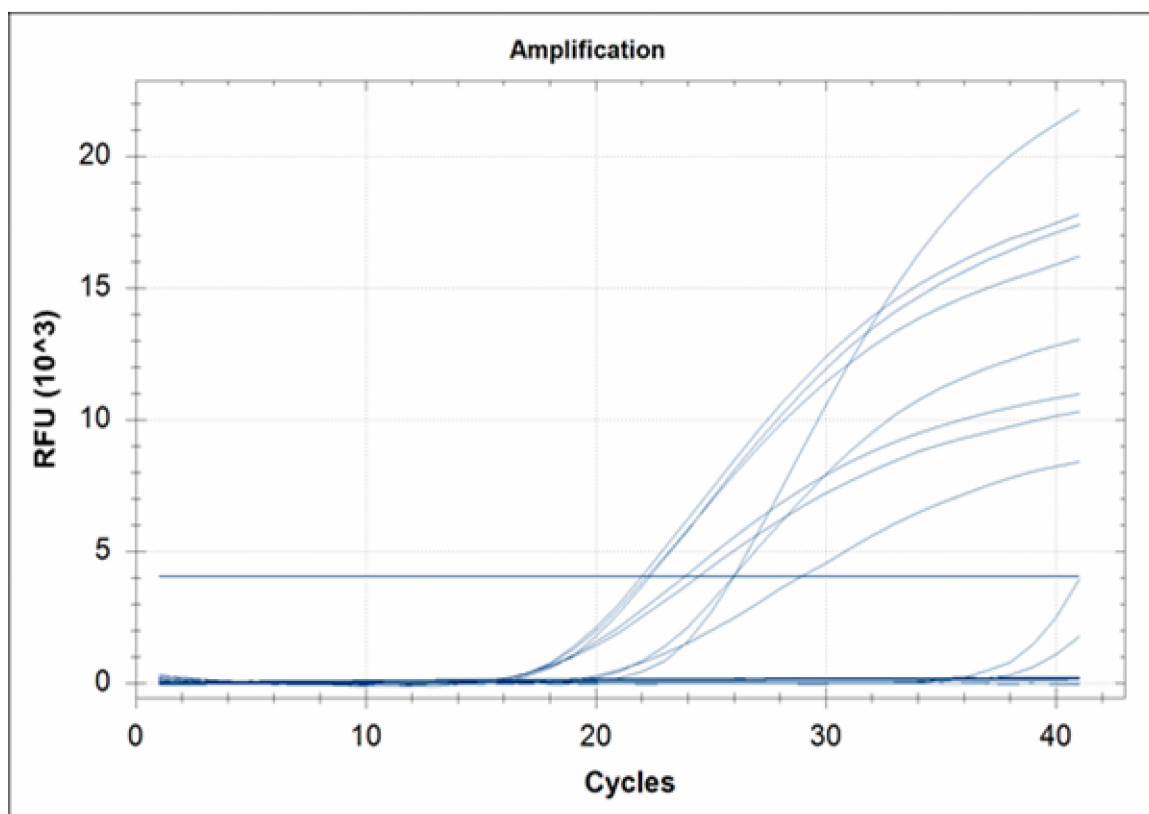


Figure 40. Amplification du gène bla_{NDM} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM		Unkn	37	24.48	24.48	0.000
A02	FAM		Unkn	37D1	22.23	22.23	0.000
B01	FAM		Unkn	70	28.96	28.96	0.000
B02	FAM		Unkn	70D1	22.01	22.01	0.000
B03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
B12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C01	FAM		Unkn	40	23.89	23.89	0.000
C02	FAM		Unkn	40D1	22.36	22.36	0.000
C03	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C04	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C05	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C06	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C07	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C08	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C09	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C10	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C11	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
C12	FAM		Unkn		N/A	0.00	0.000
D01	FAM		Pos Ctrl	T+NDM	25.99	25.99	0.000
D02	FAM		Pos Ctrl	T+NDM D1	26.01	26.01	0.000
E01	FAM		NTC	T-	N/A	0.00	0.000
E02	FAM		NTC	T-	N/A	0.00	0.000

Figure 41. Nombre de cycle de l'amplification du gène *bla_{NDM}* des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR en temps réel.

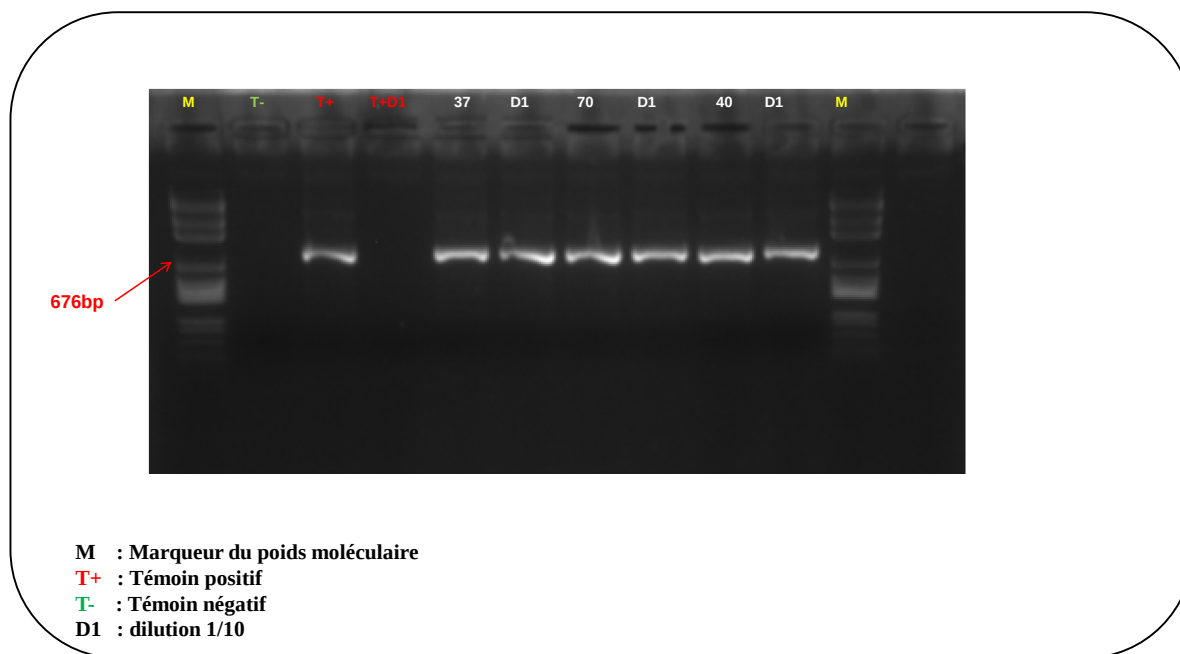


Figure 42. Amplification du gène *bla*_{NDM} des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR standard.

7.3- Séquençage et analyse nucléotidique des produits de PCR purifiés

Les résultats sont consignés dans le tableau 14. Après purification et séquençage des produits de PCR positifs, la correction des séquences par codon code aligner et la comparaison des séquences obtenues à la base de donnée NCBI, nous avons identifié 3 clusters du gène SHV (SHV-1, SHV-12, SHV-28) des souches de *E.coli* isolées. Ces techniques ont également révélé d'une part que tous les gènes TEM et CTX-M appartenaient au variant TEM-1 et CTX-M-15 respectivement, et d'autre part que les 3 souches de *E.coli* possédant des carbapénémases étaient porteuses du gène *bla*_{NDM-5}.

Le gène *bla*_{NDM-5} se diffère du gène *bla*_{NDM-1} par la substitution de 2 acides aminés aux positions : **88 (Val → Leu) et 154 (Met → Leu).**

Les 3 séquences nucléotidiques des 3 gènes *bla*_{NDM-5} ont été déposées dans la banque de donnée internationale GenBank à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) sous les numéros d'accès suivants : **KF408072, KF408073, et KF408074.**

Tableau 14. Profil moléculaire des souches de *E.coli* isolées.

Référence de la souche	Gènes codant pour les BLSE et les Carbapénémases			
Ec1	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec2	CTX-M-3	TEM-1	-	-
Ec3	CTX-M-3	TEM-1	SHV-28	-
Ec4	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec5	CTX-M-3	TEM-1	SHV-28	-
Ec6	CTX-M-3	-	SHV-28	-
Ec7	CTX-M-15	TEM-1	SHV-28	-
Ec8	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec9	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec10	CTX-M-15	TEM-1	SHV-28	-
Ec11	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec12	-	TEM-1	SHV-28	-
Ec13	-	TEM-1	SHV-28	-
Ec14	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec15	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec16	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec17	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec18	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec19	CTX-M-15	TEM-1	SHV-28	-
Ec20	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec21	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec22	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec23	-	TEM-1	SHV-1	-
Ec24	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec25	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec26	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec27	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec28	CTX-M-15	TEM-1	-	-

Tableau 14 (suite)

Ec29	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec30	CTX-M-15	TEM-1		-
Ec31	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec32	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec33	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec34	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec35	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec36	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec37	CTX-M-15	TEM-1	-	NDM-5
Ec38	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec39	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec40	CTX-M-15	TEM-1	-	NDM-5
Ec41	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec42	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec43	CTX-M-15	-	SHV-1	-
Ec44	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec45	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec46	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec47	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec48	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec49	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec50	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	-
Ec51	-	TEM-1	-	-
Ec52	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec53	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec54	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec55	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec56	-	TEM-1	SHV-1	-
Ec57	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec58	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec59	CTX-M-15	-	SHV-1	-
Ec60	CTX-M-15	TEM-1	-	-

Tableau 14 (suite)

Ec61	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec62	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec63	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec64	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec65	CTX-M-15	TEM-1	SHV-12	-
Ec66	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec67	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec68	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec69	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec70	CTX-M-15	TEM-1	-	NDM-5
Ec71	-	TEM-1	-	-
Ec72	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec73	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec74	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec75	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec76	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec77	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec78	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec79	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec80	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec81	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec82	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec83	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec84	-	TEM-1	-	-
Ec85	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec86	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec87	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec88	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec89	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec90	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec91	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec92	CTX-M-15	TEM-1	-	-

Tableau 14 (suite)

Ec93	CTX-M-15	-	SHV-28	-
Ec94	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec95	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec96	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec97	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec98	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec99	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec100	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec101	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec102	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec103	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec104	CTX-M-15	TEM-1	-	-
Ec105	CTX-M-15	TEM-1	-	-

7.4-Arbres phylogénétiques

Après une amplification du gène *bla*_{NDM} par PCR qui est ensuite séquencé et analysé, corrigé par le logiciel codan code Aligner, nous avons aligné ces séquences (Figures 43 et 44) et construit un arbre phylogénétique grâce au logiciel MEGA 5 (Figures 45).

Le logiciel MEGA 5 est un système intégré qui fournit des outils pour effectuer un alignement automatique et manuel, inférer des arbres phylogénétiques, estimer des taux de l'évolution moléculaire, déduire des séquences ancestrales et de tester des hypothèses d'évolution. Son objectif consistait à explorer, découvrir, et analyser l'ADN et les séquences protéiques dans une perspective évolutive.

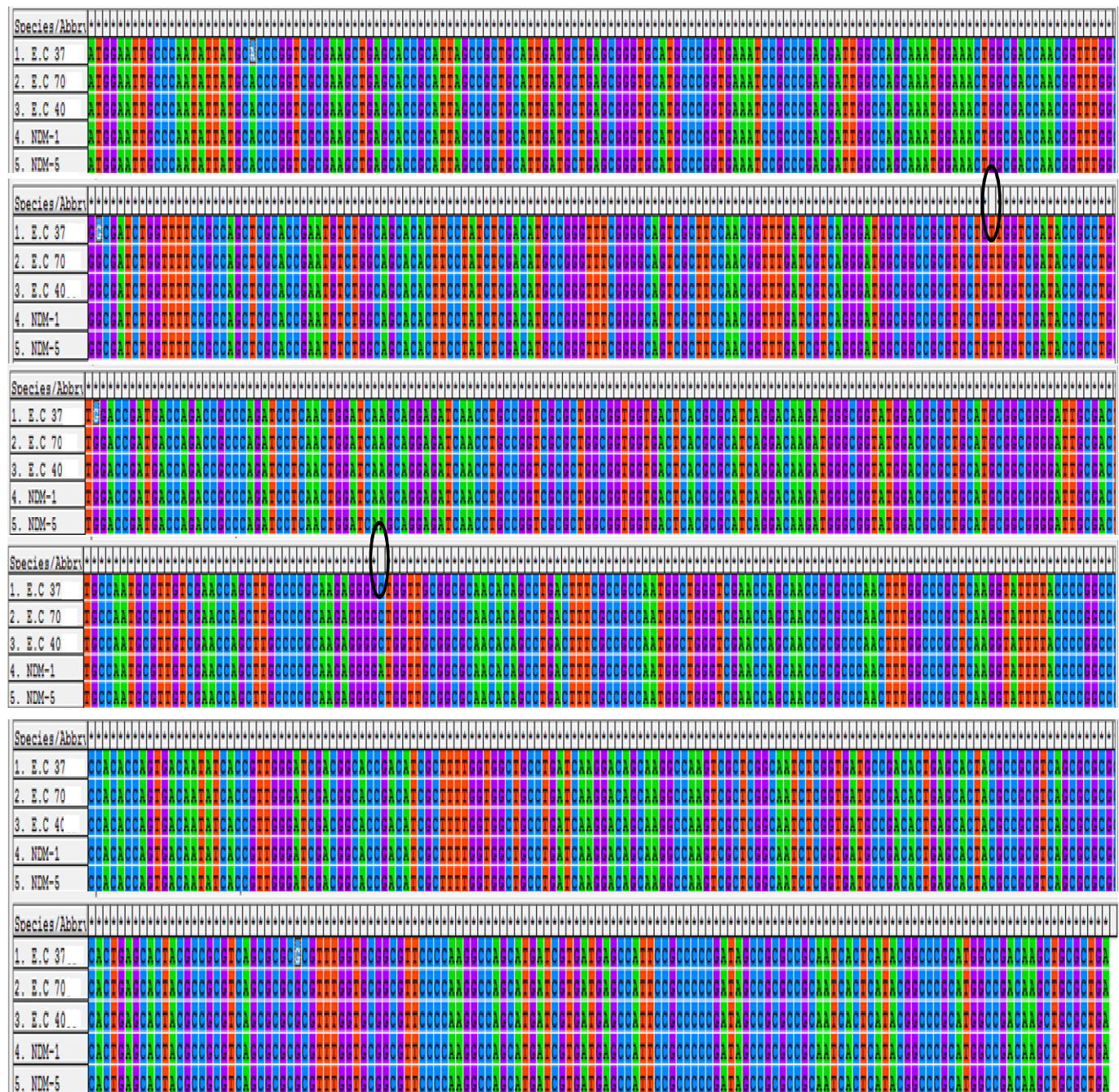


Figure 43. Alignements des nucléotides des gènes *bla_{NDM-1}* , *bla_{NDM-5}* et les 3 séquences des souches de *E.coli* IMP^R avec le logiciel MEGA 5.

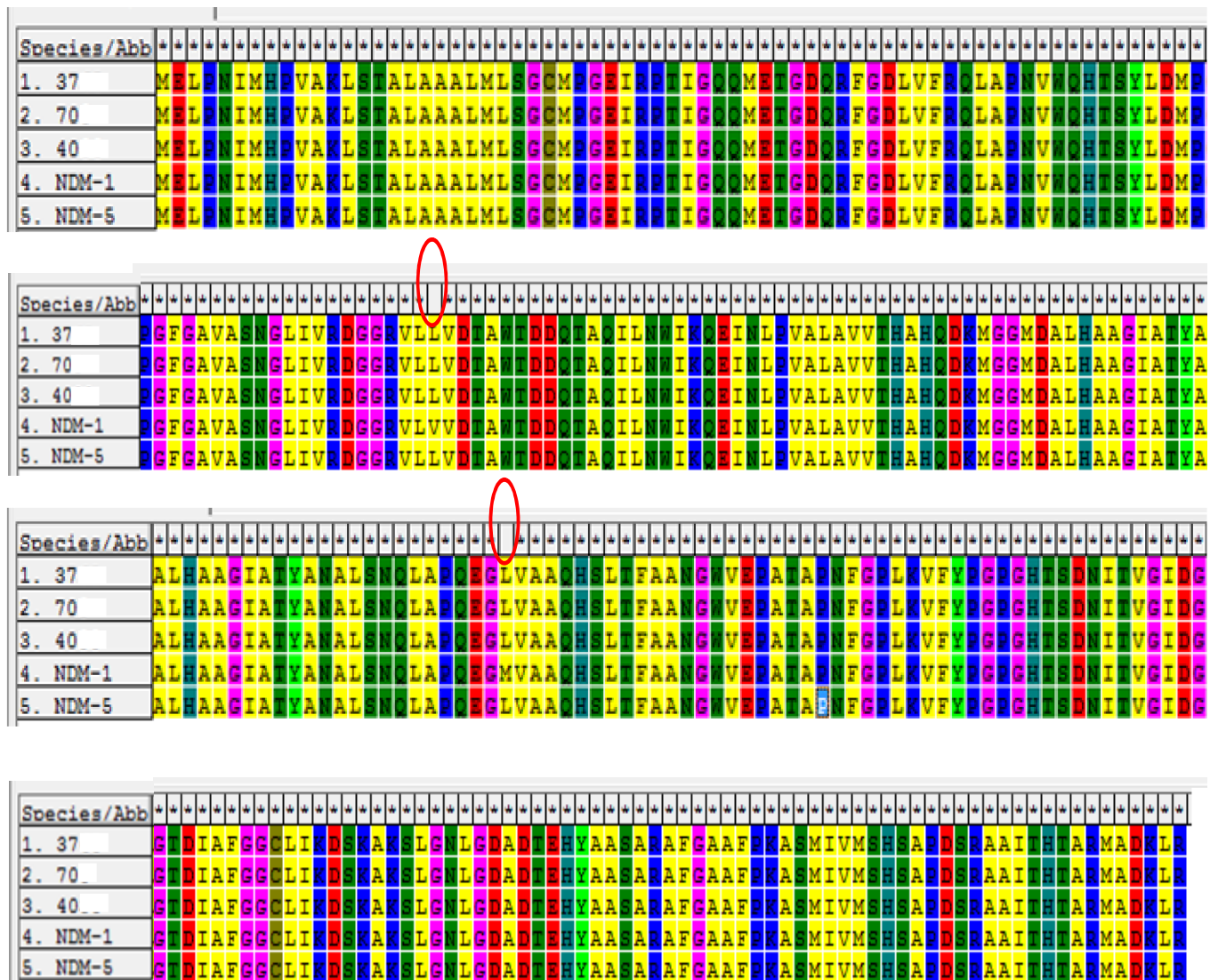


Figure 44. Alignements des acides aminés codés par les gènes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-5} et les 3 séquences des souches de *E.coli* IMP^R avec le logiciel MEGA 5

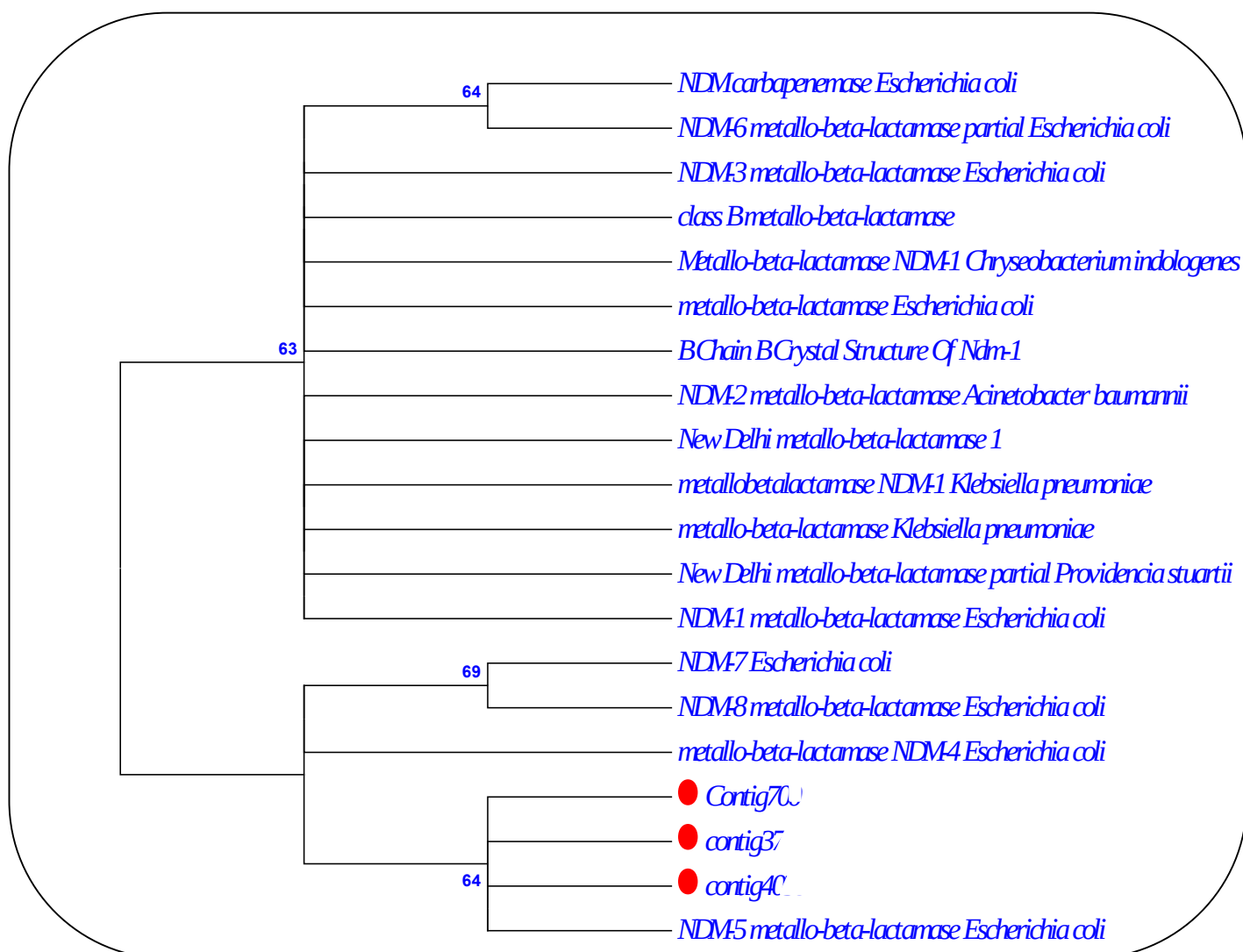


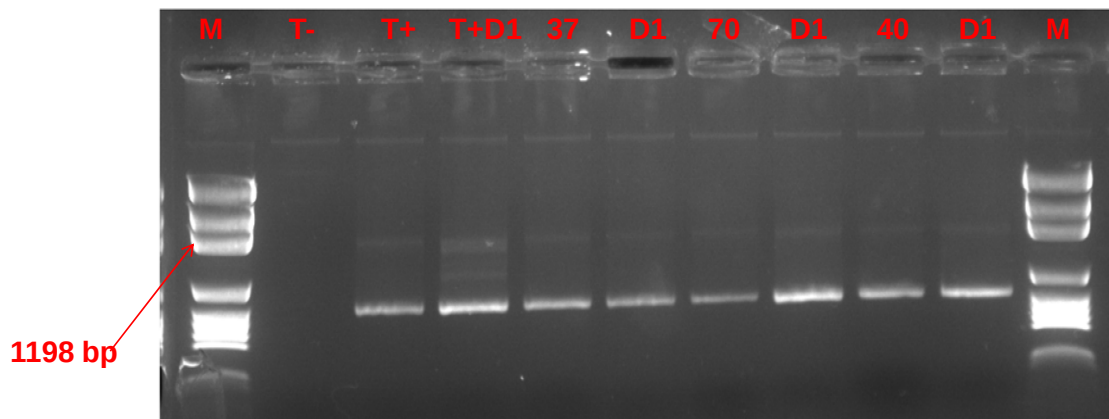
Figure 45. Arbre phylogénétique du gène *bla*_{NDM}

L'emplacement des 3 souches de *E. coli* IMP^R isolées dans cette étude est bien marqué en rouge avec le gène *bla*_{NDM-5} par rapport aux séquences universelles des clusters NDM.

8- Détection moléculaire des gènes de la résistance croisée

8.1-Résistance aux aminosides

La PCR standard et le séquençage des gènes qui codent pour la résistance aux aminosides, ont fait apparaître que les 3 souches de *E. coli* résistantes à l'imipénème portent le gène *aadA2* (figure 46). Aucune souche ne possède les gènes : *armA* et *rmtA*.



M : Marqueur du poids moléculaire
 T+ : Témoin positif
 T- : Témoin négatif
 D1 : dilution 1/10

Figure 46. Amplification du gène Aad Gr1 des 3 souches de *E.coli* IMP^R par PCR standard.

8.2-Résistance aux quinolones

Les résultats des PCR des gènes de résistance aux quinolones des 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème ont montré qu'aucune souche n'a exprimé les gènes *qnrA* et *qnrB*, cela peut expliquer que cette résistance est codée par d'autres gènes qui n'étaient pas utilisés dans cette étude.

9- Conjugaison bactérienne :

Afin de tester la transférabilité du phénotype de résistance des 3 souches de *E. coli* productrices de carbapénémases, des essais de transfert génétique par conjugaison ont été réalisés sur ces dernières, en utilisant la souche *E. coli* J53 résistante à l'azide de sodium comme souche réceptrice (figure 47).

L'identification des transconjugants par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) a montré qu'il s'agit bien des souches de *E.coli* et avec de bons scores (figure 48).

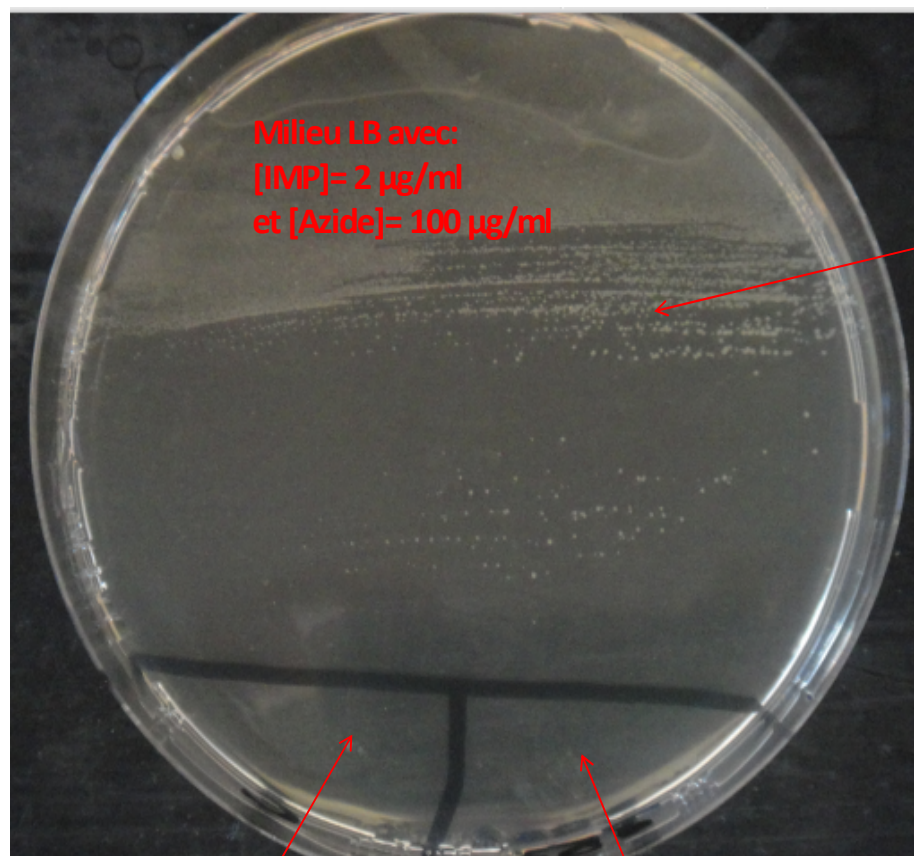
Les transconjugants avaient le même profil de sensibilité aux antibiotiques des 3 souches donatrices, sauf qu'elles étaient sensibles à l'aztréonam et la ciprofloxacine (figure 49, tableau 15).

9.1- Analyse du profil plasmidique :

L'ADN plasmidique des cellules donatrices et les transconjugants a été extrait et analysé.

L'analyse du contenu plasmidique de nos souches cliniques, a révélé qu'elles hébergent cinq plasmides avec des poids moléculaires différents (figure 50).

Après les réactions de PCR et le séquençage, nous avons constaté la présence simultanée du gène *aadA2* (figure 54) qui code pour la résistance élevée à tous les aminosides, le gène *bla_{TEM}* (figure 52) qui code pour une BLSE chez tous les transconjugants en plus du gène *bla_{NDM-5}* (figure 51) qui porte la résistance aux carbapénèmes dont la PCR du gène *bla_{CTX-M}* (figure 53) était négative, ce qui suggère que les 3 gènes (*bla_{NDM-5}*, *bla_{TEM}*, *aadA2*) soient portés par un même plasmide conjugatif et multirésistant qui peut alors disséminer entre les différentes espèces de bactéries causant ainsi des épidémies d'infections nosocomiales difficiles à traiter.



Milieu LB avec:
[IMP]= 2 µg/ml
et [Azide]= 100 µg/ml

Culture de transconjugants
J53-*E. coli* NDM-5

Absence de la souche donatrice
E. coli NDM-5

Absence de la souche
réceptrice *E. coli* J53

Figure 47. Culture du transconjugant sur le milieu selectif de Lauria Bertani (LB) additionné de 100µg/ml azide, 2µg/ml imipénème.

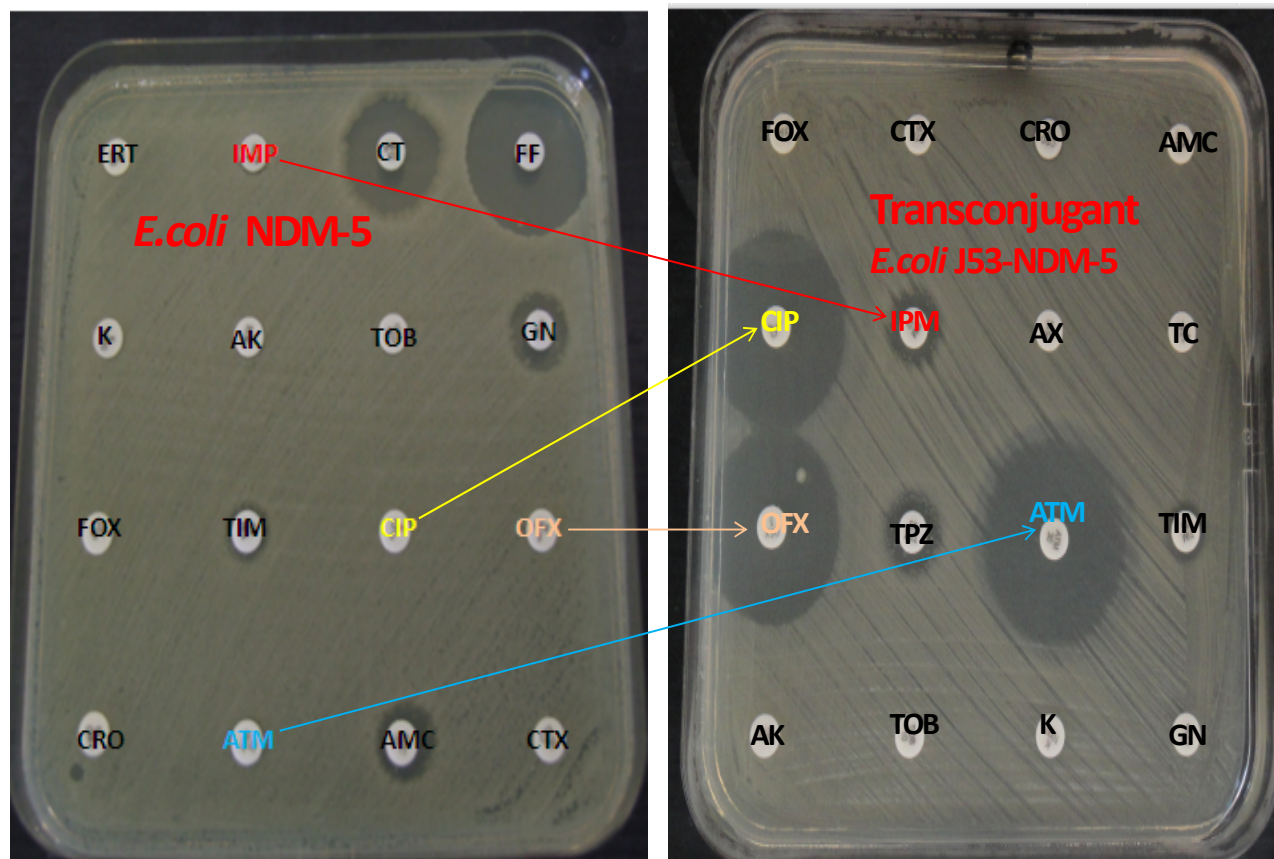
NDM-5-08-06-13-sn04421-asma-identification

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>37</u> (++) (A)	D1	Escherichia coli	2.07	Escherichia coli	2.024
<u>37</u> (++) (A)	D2	Escherichia coli	2.135	Escherichia coli	2.094
<u>37</u> (-) (C)	D3	not reliable identification	1.215	not reliable identification	1.192
<u>37</u> (-) (C)	D4	not reliable identification	1.173	not reliable identification	1.127
<u>37</u> (++) (A)	D5	Escherichia coli	2.063	Escherichia coli	2.016
<u>37</u> (++) (A)	D6	Escherichia coli	2.278	Escherichia coli	2.186
<u>37</u> (++) (A)	D7	Escherichia coli	2.143	Escherichia coli	2.079
<u>37</u> (+) (B)	D8	Escherichia coli	1.751	Escherichia coli	1.748

NDM-5-08-06-13-sn04421-asma-identification

<u>70</u> (++) (A)	D9	Escherichia coli	2.166	Escherichia coli	2.097
<u>70</u> (++) (A)	D10	Escherichia coli	2.176	Escherichia coli	2.143
<u>70</u> (++) (A)	D11	Escherichia coli	2.187	Escherichia coli	2.132
<u>70</u> (++) (A)	D12	Escherichia coli	2.227	Escherichia coli	2.226
<u>40</u> (+) (B)	E1	Escherichia coli	1.823	Escherichia coli	1.818
<u>40</u> (++) (A)	E2	Escherichia coli	2.068	Escherichia coli	2.043
<u>40</u> (++) (A)	E3	Escherichia coli	2.049	Escherichia coli	2.045
<u>40</u> (++) (A)	E4	Escherichia coli	2.13	Escherichia coli	2.044

Figure 48. Identification par MALDI-TOF-MS des 3 souches de *E.coli* transconjugants.

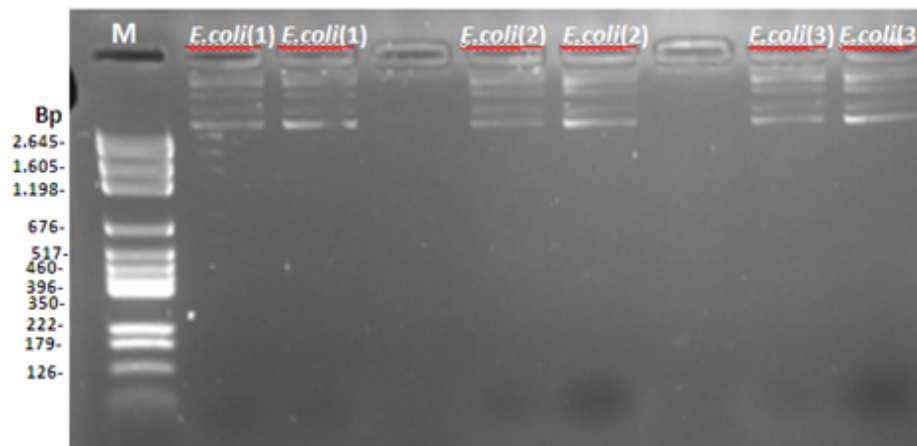


AMC: Amoxicillin +acide clavulanique , TC: Ticarcillinn, TIM:Ticarcilline+ and AC, ATM: Aztreonam, CTX: Cefotaxime, CRO:Ceftriaxone, FOX: Cefoxitine, ERT: Ertapénème, IMP: Imipénème, CT: Colistine, AK: Amikacine, TOB:Tobramycine, K:Kanamycine, GN : Gentamicine, OFX: Ofloxacin, CIP:Ciprofloxacin, FF:Fosfomycine.

Figure 49. Profil de résistance des souches donatrices (*E. coli* NDM-5) et les transconjugants (*E. coli* J53-NDM-5).

Tableau 15. Profil de résistance des 3 souches donatrices *E.coli* et les 3 souches de *E.coli* transconjugants.

Antibiotiques	MIC (µg/ml)		
	<i>E. coli</i> J53	Les 3 <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> NDM-5	<i>E. coli</i> Transconjugants J53- <i>E. coli</i> NDM-5
Ampicilline	2	>256	>256
Amoxicilline/ clavulanate	2	>256	>256
Pipéracilline/ tazobactam	1	>256	>256
Céfoxitine	4	>256	>256
Céfotaxime	2	>256	>256
Céfuroxime	4	>256	>256
Ceftazidime	0.064	>256	>256
Aztréonam	0.032	>256	0.094
Imipénème	0.25	>32	>32
Gentamicine	<1	>512	<1
Amikacine	<4	>512	<4
Tobramycine	<2	>512	<2
Ciprofloxacine	0.032	>32	0.023



M: Marqueurs plasmidiques de poids moléculaire

Figure 50. Extraction des plasmides des 3 souches de *E.coli* donatrices.

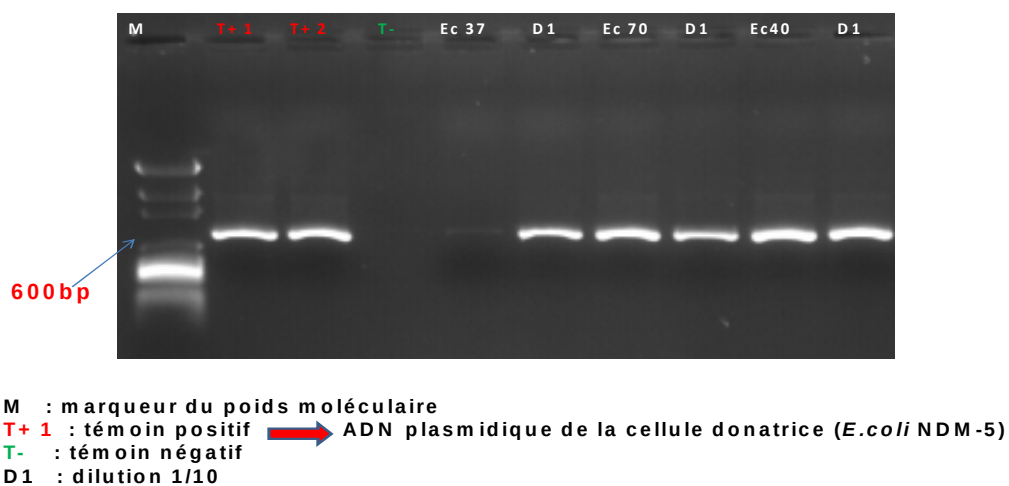


Figure 51. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène *bla*_{NDM} des 3 souches *E.coli* transconjugants (J53-NDM-5).

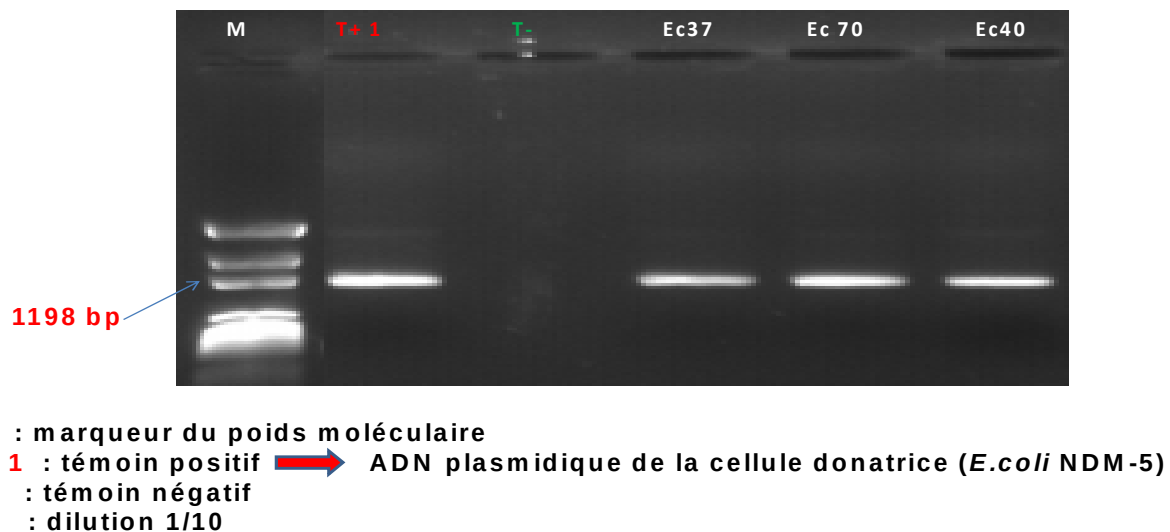


Figure 52. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène *bla*_{TEM} des 3 souches *E.coli* transconjugants (J53-NDM-5).

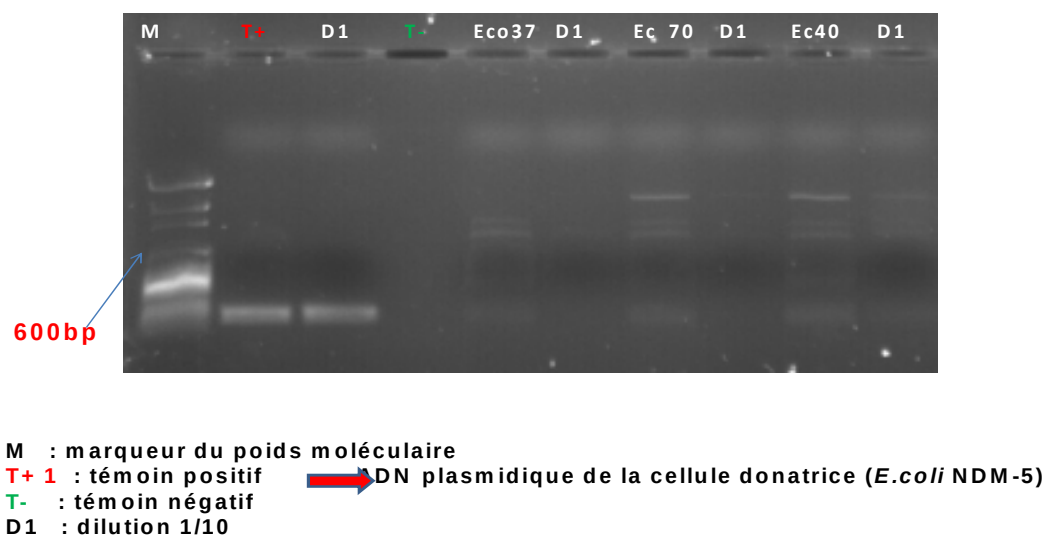


Figure 53. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène *bla*_{CTX-M} des 3 souches *E.coli* transconjugants (J53-NDM-5).

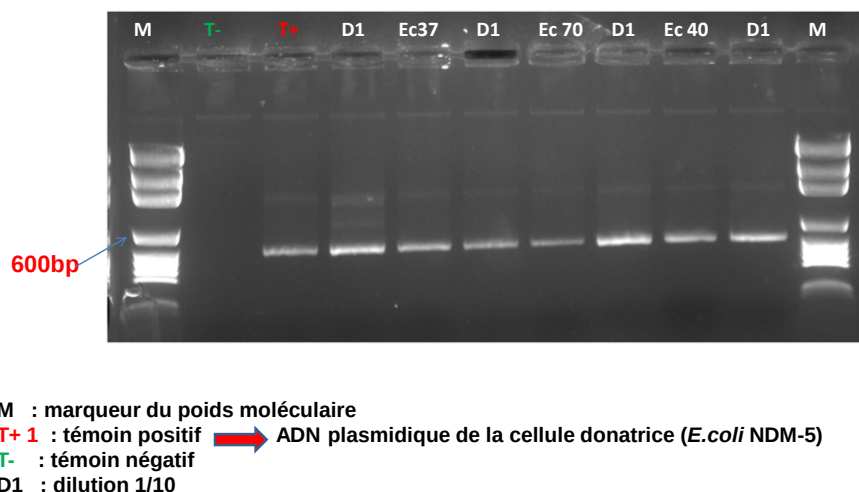


Figure 54. Amplification par PCR standard à partir d'ADN plasmidique du gène *aad* des 3 souches *E.coli* transconjugants (J53-NDM-5).

10-Génotypage par *Multi-locus sequence typing* MLST

MLST a été réalisée pour la recherche de la relation clonale de 30 souches de *E.coli* BLSE⁺ en plus des 3 souches de *E.coli* porteuses du gène *bla*_{NDM-5}. Après amplification par PCR standard des 7 gènes de ménage de l'espèce *E.coli* (*adk*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA*, et *mdh*) et le séquençage des produits des PCR des 7 gènes, les séquences obtenues ont été soumises à une base de données (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), afin d'accorder pour chaque gène un profil allélique. La combinaison des 7 allèles obtenue à partir des 7 locus sélectionnés permet de définir une séquence type (ST) pour chaque souche. Les résultats sont montrés dans le tableau 16.

Le génotypage par MLST a révélé que les 33 souches appartiennent à 20 différents ST dont 4 ST sont déjà connus en Algérie (ST405, ST2, ST131 et ST617) (Alouache et al., 2014 ; Zenati et al., 2016 ; Agabou et al., 2014). Les 16 ST restants (922, 925, 38, 2659, 2662, 959, 702, 167, 2115, 162, 224, 3502, 1196, 155, 1308), sont d'apparitions nouvelles en Algérie, mais ils étaient détectés dans d'autres pays du monde (Chattaway et al., 2014), (Kaas et al., 2012), (Stolle et al., 2013).

En ce qui concerne les 3 souches de *E.coli* résistantes aux carbapénèmes ; elles se sont avérées qu'elles appartiennent à la séquence types ST 2659 qui est différente de ST 648

Résultats

rapporté d'une souche de *E.coli* porteuse du gène *bla*_{NDM-5} isolée en Royaume uni. Pour cela nous rapportons pour la première fois au monde l'isolement de 3 souches de *E.coli* NDM-5 ST 2659.

L'arbre phylogénétique est déduit à la succession des séquences des sept gènes de ménage. Les séquences obtenues ont été alignées par le logiciel ClustalW, ensuite analysées par le logiciel Mega 5, en utilisant la méthode « *Neighbour-joining* ». L'analyse de l'arbre phylogénétique révèle la présence de 2 autres souches ST 2659 (figure 55) isolées au niveau du service de pédiatrie et des nouveaux-nés entre décembre 2012 et janvier 2013, ce qui suggère qu'une épidémie due à la dissémination d'un clone de *E.coli* productrices de BLSE et de carbapénémase, avait eu lieu au cours de cette période au sein du service de pédiatrie.

Tableau 16. Génotypage des 33 souches de *E.coli* par MLST:

Profil des allèles et leurs séquences type (ST).

Souches	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST
<i>E.coli</i> 972	6	6	71	411	24	8	7	1308
<i>E.coli</i> 908	10	11	4	8	8	13	2	167
<i>E.coli</i> 478	13	13	9	8	16	10	19	959
<i>E.coli</i> 1962	35	37	29	25	4	5	73	405
<i>E.coli</i> 135	53	38	10	97	36	152	217	702
<i>E.coli</i> 1821	53	40	47	13	36	28	29	131
<i>E.coli</i> 212	6	6	33	26	11	8	2	1196
<i>E.coli</i> 1261	20	45	41	43	5	32	2	2662
<i>E.coli</i> 320	4	26	2	25	5	5	19	38
<i>E.coli</i> 84	8	7	1	8	8	5	6	2115
<i>E.coli</i> 37	4	26	2	312	5	8	19	2659
NDM-5								
<i>E.coli</i> 70	4	26	2	312	5	8	19	2659
NDM-5								
<i>E.coli</i> 40	4	26	2	312	5	8	19	2659
NDM-5								

Tableau 16 (suite).

Souches	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST
<i>E.coli</i> 2	5	3	2	6	45	5	4	2
<i>E.coli</i> 3444	6	4	33	16	11	8	6	224
<i>E.coli</i> 295	10	11	4	8	8	13	73	617
<i>E.coli</i> 49	8	7	1	8	8	5	6	2115
<i>E.coli</i> 85	21	399	27	8	5	5	4	922
<i>E.coli</i> 153	6	6	33	16	11	8	6	3503
<i>E.coli</i> 2495	6	6	33	26	11	8	2	1196
<i>E.coli</i> 206	10	11	4	8	8	13	2	167
<i>E.coli</i> 486	9	65	5	1	9	13	6	162
<i>E.coli</i> 3736	6	4	14	16	24	8	14	155
<i>E.coli</i> 951	35	37	29	25	4	5	73	405
<i>E.coli</i> 1554	5	37	111	6	45	5	4	925
<i>E.coli</i> 1699	13	13	9	13	16	10	4	959
<i>E.coli</i> 66	4	26	2	312	5	8	19	2659
<i>E.coli</i> 485	5	3	2	6	45	5	4	2
<i>E.coli</i> 2625	35	37	29	25	4	5	73	405
<i>E.coli</i> 2015	35	37	29	25	4	5	73	405
<i>E.coli</i> 3965	4	26	2	312	5	8	19	2659
<i>E.coli</i> 415	5	3	2	6	45	5	4	2

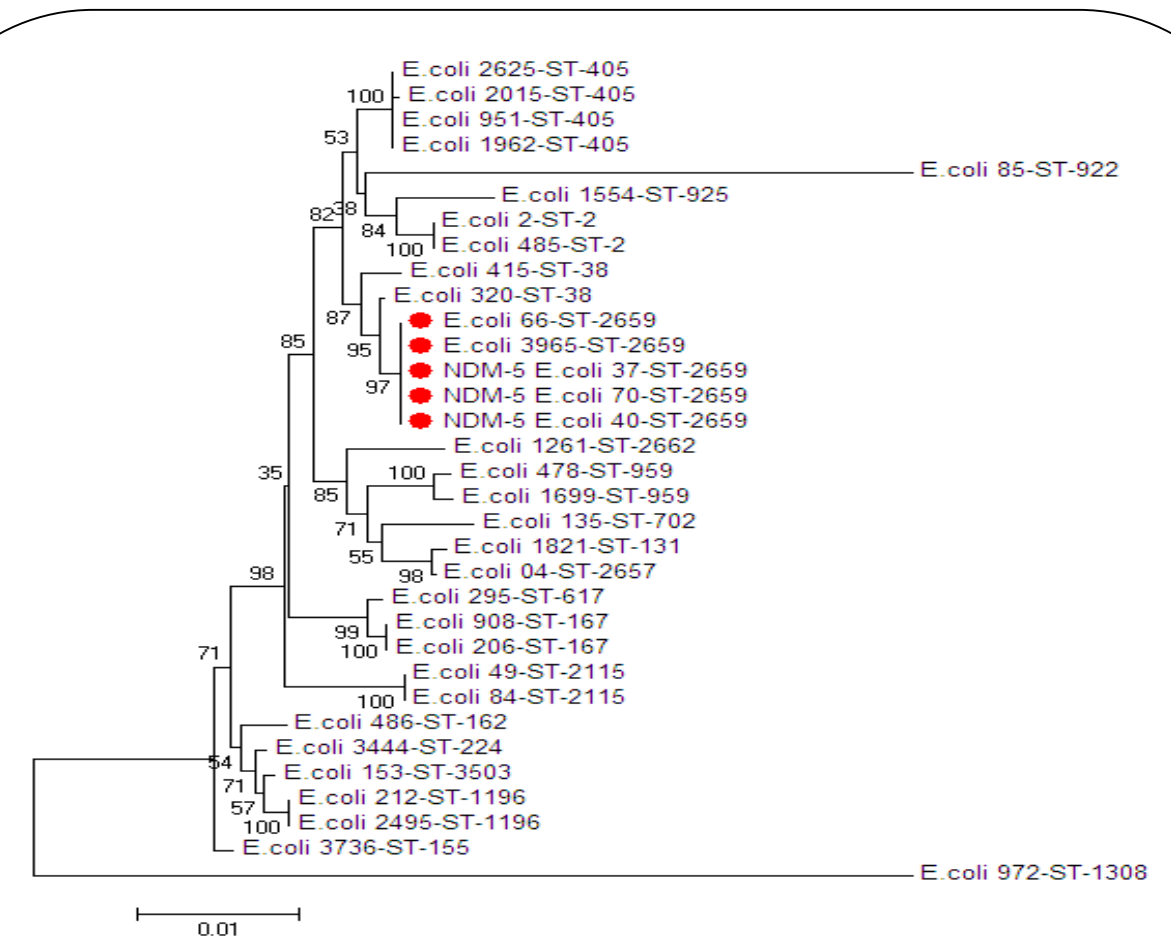


Figure 55. Arbre phylogénétique concaténé montrant les relations moléculaires des sept gènes analysés (*adh*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA*, et *mdh*) de 33 souches cliniques de *E. coli*, y compris les trois isolats NDM -5- positifs. Les cercles rouges indiquent les souches de *E. coli* appartenant à la séquence type 2659.

Discussion

Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant, qui affecte de nombreux pays, bien que les souches résistantes soient souvent différentes d'un pays à l'autre. Cette résistance est une réalité présente et une menace pour l'avenir par son impact sur la morbidité et la mortalité dans le monde. (**Kaye et al., 2000 ; Schwaber et al., 2006 ; Lavigne et al., 2007 ; Rodriguez et al., 2008**) "Une ère post-antibiotiques", où des maladies et infections aujourd'hui traitables pourraient redevenir mortelles : c'est ce que prédit un rapport alarmant de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) publié le 30 avril 2014 (**Antimicrobial resistance global report on surveillance, 2014, www.who.int**).

Les antibiotiques représentent l'un des progrès thérapeutiques les plus importants du XXe siècle, ce sont l'un des piliers de notre santé, mais comme le prédisait Alexander Fleming, les bactéries sont capables de développer des moyens de protection contre ces traitements (**Noah., 2009**). Parmi les bactéries responsables d'infections bactériennes, les entérobactéries sont les plus redoutables, car elles peuvent être productrices des carbapénèmases ainsi qu'elles possèdent d'autres mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques (**Walsh et al., 2005 ; Queenan et Bush., 2007**). La concentration importante de ces bactéries dans le tube digestif, favorise l'échange et la dissémination des gènes de résistance (**Denton., 2007; Sekhsokh et al., 2008**).

E.coli étant la bactérie plus fréquemment impliquée dans les infections humaines aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (**Macgowan et al., 1993**). Elle représente l'agent responsable de la très grande majorité des cas d'infections du tractus urinaires spontanées ou après instrumentation, elle est aussi responsable d'infections digestives ; génitales ; septicémie ; méningites (**Mokady et al., 2005**) et des syndromes diarrhéiques (**Levine et al., 1984 ; Croxen et al., 2010**).

Notre étude a porté sur l'isolement des souches de *E.coli* durant une période de 14 mois (du Janvier 2012 au Février 2013), à partir de différents prélèvements bactériologiques reçus au laboratoire central de Microbiologie du CHU Dorban d'Annaba dont les objectifs consistaient à identifier les cas possibles d'acquisition hospitalière des souches de *E.coli* résistantes aux antibiotiques, de mettre en évidence la prévalence des souches productrices de BLSE et des

carbapénèmases, d'identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones, d'étudier la possibilité de transfert de cette résistance entre les bactéries et enfin, le typage moléculaire des souches de *E.coli*.

- **Fréquence d'isolement des de *E.coli* dans les produits pathologiques**

Durant notre travail, 105 prélèvements sont recueillis dans ce laboratoire dont 37,14% des prélèvements provenant du milieu externe contre 62,85% provenant du milieu hospitalier, nos résultats sont proches à ceux rapportés en Espagne en 2006 où les malades hospitalisés ont présenté un taux de 65% (**Jesu's et al., 2006**). Selon (**Farrell et al., 2003; Matute et al., 2004; Zhanel et al., 2006; Bouzenoune, 2009, Ahmad et al., 2015**), *E.coli* est l'espèce bactérienne principale impliquée dans les infections urinaires, puisqu'elle représente 50 à 80% des agents en cause. Ceci correspond aux résultats obtenus dans notre étude avec un taux de 70,47%. En revanche, nous rapportons un taux nettement supérieur à celui identifié en Australie en 2016 par (**Segagni et al., 2016**), qui avait montré que 21,3% des prélèvements isolés sont des prélèvements urinaires. Une étude réalisée en France en 2000, avait montré que 91,1% des prélèvements communautaires étaient des prélèvements urinaires (**Péan et al., 2001**). En effet, ce résultat est expliqué par le fait que l'infection urinaire est l'une des infections communautaires les plus fréquentes notamment chez les femmes (**Sekhsokh et al. , 2008**).

Selon le NHSN (**National Healthcare Safety Network**), *E. coli* est responsable de 12 % de l'ensemble des infections urinaires aux Etats-unis, classée ainsi en troisième position parmi tous les agents pathogènes incriminés (**Sievert et al., 2013**) Cependant, d'après le réseau de l'Antibio-Résistance en Tunisie (LART), *E. coli* est essentiellement isolée d'infections urinaires en milieu hospitalier avec un taux de 84,4% (**L'Antibio-Résistance en Tunisie. 2011**). Cela pourrait s'expliquer par les facteurs spécifiques d'uropathogénicité. En effet, *E. coli* est une bactérie qui possède des adhésines (adh P1S, adh Afa) capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par la vidange vésicale (**Sekhsokh et al. , 2008**). Par ailleurs, l'infection urinaire est une pathologie fréquente en pédiatrie (**Steven et al., 2006**). La plupart des souches de *E. coli* ont été isolées essentiellement chez les patients admis à l'hôpital pédiatrique Sainte Thérèse (33,33%) qui regroupe les services suivants : pédiatrie, réanimation pédiatrique et le service de néonatalogie. Ceci est peut être due à une épidémie et / ou une situation endémique dans l'unité, puisque la majorité des isolats provenaient de ces services dans une courte période. En outre, la catégorie des patients

hospitalisés dans cette structure hospitalière est représentée par la population néonatale et pédiatrique. En plus du bas âge et l'incompétence immunitaire de cette population, plusieurs facteurs de risque peuvent être responsables, notamment le cathétérisme des voies urinaires, les mauvaises conditions d'hygiène et la fréquence de la transmission manu portée par le personnel soignant (**Hamza et al., 2008**).

En Tunisie, *E. coli* a été isolée des infections nosocomiales avec une fréquence de 23,3 % en pédiatrie (**L'Antibio-Résistance en Tunisie., 2011**). En Turquie, elle était responsable de 26% d'infections nosocomiales en service de pédiatrie (**Kuzdan C., 2014**). En Chine, cette espèce, était responsable de 26,9% d'infections nosocomiales chez l'enfant (**Yang et al., 2013**).

Au niveau des pus, *E. coli* a été isolée dans 18,09% des cas. nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés en Chine par (**Fan et al., 2016**) ou le taux était de 29,1%. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude de **Fan**, *E. coli* était isolée uniquement des pus obtenus des infections intra-abdominales. Alors que, dans notre étude *E. coli* était isolée de différents produits pathologiques.

Nous avons rapporté des taux de (4,76% et 1,90%) d'isolement de *E.coli* dans les prélèvements (sang et LCR) respectivement. (**Anago et al., 2015**) à Cotonou, dans leur étude, avaient trouvé un taux de 2,38% d'isolement de *E.coli* dans le LCR. La relative rareté de *E.coli* dans les liquides biologiques (sang, LCR) normalement stériles pourrait s'expliquer par le fait que pour les atteindre, les bactéries doivent vaincre un certain nombre d'obstacles, notamment la barrière due au système immunitaire de l'hôte. En effet, nous dirons que la survie des bactérie ayant franchi le sang, n'est possible que, lorsque les anticorps spécifiques sont absents ou que leur capacité est dépassée (**Mary et al., 1994**).

Selon le bilan de surveillance de la résistance des bactéries en 2009, en Algérie, Le sang représente le principal réservoir des entérobactéries (**Benslimani, 2009**). Contrairement aux autres études, qui avaient montré que les entérobactéries ont été isolées principalement dans les urines (**Belmonte et al., 2010 ; Mayoral et al., 2010, Mkaouar et al., 2008**) ont noté que la plupart des souches résistantes ont été isolées dans les liquide de ponction, les prélèvements pulmonaires, et le liquide céphalo-rachidien avec 51%, 47%, et 42% respectivement. La majorité des liquides de ponction provenaient des malades hospitalisés dans les unités de soin intensifs, qui sont le plus souvent porteurs de dispositifs invasifs (**Mkaouar et al., 2008**).

- **Répartition des souches de *E.coli* selon le sexe, l'âge et le service**

La répartition de nos souches selon le sexe fait ressortir une légère prédominance féminine avec un sexe ratio (M/F) de 0,98, cela peut s'expliquer par le fait que les prélèvements d'origine urogénitale étaient très largement majoritaires. En effet, la prédominance des femmes dans notre étude concorde avec la littérature sur les infections urinaires à uropathogènes, comme rapporté par **(Pitout et al., 2008 ; Rodríguez-Baño et al., 2008)**, et s'explique avant tout par des raisons anatomiques, car les glandes périurétrales n'ont pas d'activité antibactérienne (contrairement au liquide prostatique). Aussi, l'infection chez la femme est favorisée par l'osmolarité faible des urines en particulier durant la grossesse **(Hackenhaar et al., 2013)**. Par ailleurs, cette différence reste statistiquement non significative car ce critère physiologique ne semble pas influencer les infections nosocomiales **(Kariuki et al., 2007)**. Par contre l'âge, qui est en rapport avec le statut immunitaire des patients, est en effet un des facteurs de risque pour l'infection par *E. coli* **(Colodner et al., 2004 ; Samanta et al., 2011)**.

Dans notre étude, toutes les tranches d'âge ont été touchées par les infections à *E. coli*, et les extrémités d'âge, variant entre 7 jours et 88 ans. La tranche d'âge prédominante (49,52%) représente la population des personnes âgées (> 50 ans), cela pourrait être lié à la plus grande fréquence de comorbidités et d'hospitalisation dans cette tranche d'âge **(Ben-Ami R et al., 2006)**. Ainsi, qu'en plus des patients externes qui occupent la grande partie de cette catégorie d'âge, on a remarqué la présence de cette population dans tous les autres services avec de grands pourcentages. Dans les travaux portant sur les infections en milieu communautaire dont une méta-analyse multinationale (Europe, Asie et Amérique du Nord) les comorbidités associées rapportées étaient le diabète, les pathologies pulmonaires, neurovasculaires et rénales **(Ben-Ami R et al., 2009 ; Rodríguez-Baño et al., 2008)**.

Dans le présent travail, le service le plus touché par les infections à *E.coli* a été l'infectieux avec un taux de 16,19%, où le site urinaire avait présenté le principal site d'infection dans ce dernier. Le second service a été le service de réanimation médicale. Des études récentes ont montré que le problème de l'accroissement de la fréquence des souches bactériennes résistantes est majeur pour les patients hospitalisés en réanimation **(Marianna et al., 2009)**. La pression de sélection exercée par une consommation d'antibiotiques, le long séjour à l'hôpital, la vulnérabilité des patients hospitalisés favorisent l'apparition des bactéries

multirésistantes et la dissémination de ces souches entre les patients (**Robin et al., 2010; Budak et al., 2014 Chang et al., 2015**).

Le service d'endocrinologie a présenté un taux de 2,85% dans cette étude, ce dernier regroupe généralement des sujets âgés diabétiques qui sont prédisposés à développer des infections des plaies et des blessures. Le facteur de risque principal dans ce service est le diabète avec une fréquence élevée de lésions de pied diabétique qui constitue une complication grave avec un risque d'amputation et de mortalité après amputation. Une étude récente faite au niveau du CHU d'Annaba, qui a porté sur la caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des pieds diabétiques a montré que l'espèce *E.coli* occupe la troisième place avec une fréquence de 60% dans les infections des pieds diabétiques après *S. aureus* (85, 9%) et *k. pneumoniae* (83, 8%) (**Djahmi et al., 2013**).

- **Résistance des souches de *E.coli* aux antibiotiques**

E.coli est naturellement sensible à tous les antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif (BGN), toute fois, on observe de plus en plus l'émergence de souches résistantes aux bêta-lactamines ; aux aminosides ; aux quinolones etc (**Macgowan et al., 1993**). L'impact de la consommation des antimicrobiens sur l'apparition de la résistance est bien documenté soit à l'échelle d'un service hospitalier, d'un pays, d'un continent voire le monde entier (**Nienke et al., 2008**).

Les antibiotiques n'induisent pas en eux même la résistance, mais ils entraînent une sélection des mutants résistants en diminuant voire en détruisant la microflore normale sensible permettant ainsi aux bactéries résistantes de proliférer (**Nienke et al., 2008**)

De nombreuses études ont montré le rôle prépondérant des antibiotiques dans l'émergence des bactéries résistantes (**Ankur et al., 2009**). L'utilisation des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) a été rapportée comme étant la classe la plus importante (**Du et al., 2002 ; Kim et al., 2002 ;**), à coté des C3G, d'autres antibiotiques ont été incriminés à savoir les quinolones (**Du et al., 2002 ; Rodríguez-Baño et al., 2008**), les aminoglycosides, et le triméthoprime sulfaméthoxazole (**Graffunder et al., 2005**). Une étude en Espagne a montré que l'usage préalable des antibiotiques dans un service hospitalier multipliait le risque d'émergence de *E.coli* résistante par 3,7 pour les aminoglycosides, 12,3 pour les C3G et 4,5 pour les fluoroquinolones (**Rodríguez-Baño et al., 2008**).

Concernant les bêta-lactamines, d'une manière générale et sur toute la période d'étude, les souches de *E.coli* avaient présenté une résistance à 100% à l'amoxicilline, ticarcilline et 47,61% à l'Amoxicilline+acide clavulanique (AMC). Messai et al en 2006 dans un hôpital militaire à Alger, avaient rapporté dans leur étude des taux inférieurs aux nôtres, avec respectivement (69.5% et 2%) pour l'amoxicilline et l'AMC (**Messai et al., 2006**). En comparant nos résultats avec ceux signalés par Messai et al, on observe une augmentation significative de la résistance des souches cliniques de *E.coli*, vis-à-vis à ces antibiotiques en Algérie, au fil des années. Cela pourrait être dû à la prescription en Algérie de l'Amoxicilline et de l'AMC particulièrement en médecine ambulatoire (traitement à l'aveugle) qui se fait avant même d'avoir demandé un examen bactériologique. En outre l'Amoxicilline est également disponible en Algérie sous sa forme galénique par voie orale et en générique à un prix plus abordable. Ainsi, on pourrait ajouter les traitements incomplets (doses faibles, délai de prise en charge insuffisant ou discontinu etc...).

La menace existe dans les pays développés et surtout dans les pays en voie de développement où cohabitent l'automédication et la vente anarchique d'antibiotiques en dehors des structures légales. Citons ainsi, l'étude d'**Anago et al** à Cotonou, Bénin (Afrique) qui avaient rapporté des taux de (94% et 92.8%) respectivement pour l'amoxicilline et l'AMC (**Anago et al., 2015**), ainsi que celle de **Akinduti et al** au Nigéria qui avaient trouvé un taux de résistance à 100% pour l'amoxicilline et 64,7% pour l'AMC (**Akinduti et al., 2016**).

Aussi, nous avons observé une résistance à 100% de nos souches aux céphalosporines de 1^{ière} et 3^{ème} génération (céfazoline, céfotaxime) et à l'aztréonam.

Nous remarquons que nos taux de résistance sont généralement plus élevés à ceux rapportés par le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (AARN). En effet, selon le dernier rapport d'évaluation correspondant à la période (Janvier 2011 à Décembre 2011), sur l'ensemble des souches testées : 51,69%, et 57,31%, étaient résistantes aux C3G et à l'AMC respectivement (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2012**). En Tunisie, selon le dernier rapport du réseau tunisien de surveillance, la fréquence de *E.coli* résistantes au C3G était de 6,2% en 2011 (**L'Antibio-Résistance en Tunisie. 2011**).

Le dernier rapport de l'**European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net) 2014** a montré une augmentation significative, relativement au rapport fait en 2012, du taux de résistance des souches de *E.coli* aux C3G au niveau des pays européens (de 3,3% en Islande à 40,4% en Bulgarie), ainsi que la majorité des pays situés dans le sud et le sud-est de

l'Europe ont rapporté des pourcentages de résistance de 25% ou plus (**Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2014**).

Le programme **Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) 2009** qui a étudié l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans la région de l'Asie-Pacifique, a révélé que la résistance aux C3G des souches de *E.coli* isolées dans cette région était de l'ordre de 36,8% (**Chen et al., 2011**).

Dans cette étude, sur les 105 souches cliniques de *E.coli*, 85 souches étaient productrices de BLSE, de ce fait nous rapportons un taux élevé (80,95%) de *E.coli* BLSE⁺ observées en 2011 et 2012 au CHU d'Annaba. Cette prévalence est élevée par rapport à celle de la Turquie (50%) (**Seniha et al., 2014**), et l'Arabie Saoudite (60%) (**Mumtaz et al., 2012**) et inférieure à celle de l'Inde (91%) (**Chand et al., 2014**).

Le phénotype de résistance céphalosporinase de haut niveau, a été caractérisé dans ce travail chez 20 souches de *E.coli* productrices de BLSE et résistantes en même temps au céfoxitine. Une étude recherchant les facteurs de risque d'infection par *E. coli* BLSE, a montré que : l'âge supérieur à 60 ans, le sexe féminin, le diabète, une infection urinaire récente, le caractère nosocomial de l'infection et l'antibiothérapie par aminopénicillines, céphalosporines et fluoroquinolones étaient des facteurs de risque d'infection à *E. coli* BLSE (**Rodriguez-Bano et al., 2008**).

Les options thérapeutiques sont donc limitées devant des infections impliquant de telles souches multirésistantes et font appel dans la majorité des cas aux carbapénèmes. En revanche, l'utilisation abusive de ces molécules n'était pas sans conséquences. Plusieurs études ont montré l'émergence de souches « pan résistantes » (résistantes à tous les antibiotiques) par l'association de multiples mécanismes de résistance (**Aubron et al., 2005 ; Overturf., 2010**). L'émergence et la dissémination d'entérobactéries productrices de carbapénémases dans différentes régions du monde représentent une menace importante notamment dans le cadre des infections nosocomiales. Depuis le début des années 2000, la première souche d'entérobactéries productrice de carbapénémase a été une *K. pneumoniae*, elle a été d'abord décrite dans l'est des États-Unis, puis, ces souches ont rapidement disséminé dans de nombreuses régions du monde (**Yigit et al., 2001**). Par exemple en Europe, et selon le dernier rapport de l'**EARs-net**, le pourcentage des souches de *E.coli* résistantes aux carbapénèmes varie de 0 à 1,2% dans la majorité des pays Européens (**Antimicrobial resistance surveillance in Europe., 2014**).

Dans notre étude, trois (3) souches de *E. coli* ont présenté des résistances aux carbapénèmes (imipénème) avec un taux de 2,85%, Selon le réseau national de la surveillance des bactéries

résistantes aux antibiotiques en 2009 (**Benslimani, 2009**), la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries commence à disséminer dans les hôpitaux algériens où **Robin et al** ont rapporté (deux *E.coli*, deux *K. pneumoniae* et une *Providencia stuartii*) résistantes aux carbapénèmes à l'hôpital militaire au centre d'Alger (**Robin et al ., 2010**).

Nous croyons donc que le traitement des BGN incluant principalement les entérobactéries nécessite l'utilisation des aminosides le plus souvent en association avec les bêta-lactamines, mais leur large utilisation a contribué à l'émergence de souches résistantes. Dans la présente étude, la résistance aux aminosides était assez marquée pour la gentamicine avec un pourcentage de 90,47% suivie par 91,42% pour la kanamycine et 23,8% pour l'amikacine. Cependant, le dernier rapport de l'ARRN rapporte des taux de 9,67 % et 2,94 % de résistance de *E.coli* à la gentamicine et à l'amikacine respectivement (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques., 2012**). En Tunisie, la résistance de *E.coli* à la gentamicine et à l'amikacine était de 9,8% et 2,8% des cas respectivement (**L'Antibio-Résistance en Tunisie., 2011**). Selon nos résultats, l'amikacine reste la molécule la plus efficace avec 23,8% de souches résistantes, comme il a été rapporté dans plusieurs études (**Cantas et al., 2016; Blanco et al., 2016**).

La sensibilité des souches de *E.coli* aux Aminosides pourrait s'expliquer par leurs formes galéniques (injectables), par l'administration au niveau systémique, directement dans le sang et leur diffusion plus large par rapport aux voies orales à résorption faible. Concernant la résistance aux quinolones et les fluoroquinolones, des taux de résistance de 86,66 % et 74,28 % ont été observés pour l'acide nalidixique et la ciprofloxacine respectivement. Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés dans L'ARRN (32,07% pour l'acide nalidixique et 20,46% pour la ciprofloxacine) (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques., 2012**), et LART (21,3% pour l'acide nalidixique 16,7% pour la ciprofloxacine) (**L'Antibio-Résistance en Tunisie., 2011**).

En ce qui concerne les autres molécules d'antibiotiques testées, nos souches étaient très résistantes au cotrimoxazole avec un taux de 79,04% de résistance, nos résultats corroborent avec ceux de **Somily et al** et en Arabie Saoudite, ainsi que ceux de **Ferdosi et al** en Iran qui avaient trouvé respectivement (71, 1% et 82%) de résistance au cotrimoxazole (**Somily et al., 2014 ; Ferdosi et al., 2015**). Cette augmentation de la résistance pourrait être le fait d'une utilisation abusive et anarchique de ces antibiotiques par la population liée à leur coût moins élevé.

En revanche, la totalité de nos souches était sensible à la colistine. Compte tenu de l'émergence de souches « pan résistantes », les polymyxines ont été réintroduites dans le

protocole thérapeutique, notamment en service de réanimation, pouvant expliquer l'apparition de souches résistantes à cette molécule.

La résistance acquise aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur et plus que jamais d'actualité avec la diffusion massive des BLSE.

En Algérie, selon le rapport AARN publié en 2012, les souches productrices de BLSE représentent 30,28% des isolats d'entérobactéries en milieu hospitalier (N=4726), les données retenues étant celles de 12 laboratoires. L'espèce *E.coli* a présenté une fréquence d'isolement à l'Hôpital de l'ordre de 17,31 % (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques., 2012**).

Le dernier rapport d'EARS-net 2014 a révélé que les 22 pays européens ont montré un taux de production des BLSE pour les souches de *E.coli* résistantes aux C3G compris entre 71,1% et 100 %, dont la majorité des pays a déclaré des pourcentages supérieurs à 90% (**Antimicrobial resistance surveillance in Europe., 2014**).

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette dissémination: les facteurs épidémiologiques, socioéconomiques (pauvreté, hôpitaux surchargés, faible taux de ratio infirmière-patients, et l'hygiène hospitalière déficiente), ce qui entraîne des taux élevés de colonisation et d'infection.

- **Support génétique de la résistance**

Le support génétique des enzymes BLSE produits par les 105 souches de *E.coli* isolées à l'Hôpital Dorban à Annaba était varié. Le type CTX-M a été détecté chez 98 (93,33%) des isolats, le type SHV chez 33 (31,42%) des isolats et 95 (90,47%) des isolats hébergeaient le gène TEM. Chaque souche (105) produisait plus d'une BLSE.

Les entérobactéries produisant une BLSE sont toujours d'actualité dans les structures de soins, malgré les mesures de prévention de leur dissémination, on observe plutôt une augmentation de leur nombre, en particulier, avec des BLSE de type CTX-M alors que les BLSE plus « anciennes » de la famille des TEM ou des SHV semblent diminuer (**Giraud-Morin et Fosse., 2008**). Les enzymes du type CTX-M ont eu un fort succès épidémiologique et ont diffusé dans le monde entier (**Doit et al., 2010**), ces enzymes semblant avoir une capacité particulière de dissémination mondiale (**Nicolas-Chanoine et al., 2008**), en Tunisie (**Elhani et al., 2011**), Maroc (**Barguigua et al., 2011**), Nigéria (**Olowe et al., 2010**), Mali (**Duval et al., 2009**), Portugal (**Mendonça et al., 2009**), Chine (**Liu et al., 2009**), Taiwan (**Shu et al., 2010**) et aux nombreux pays du monde. . Des études à l'échelle nationale ont montré que les CTX-M-15 et CTX-M-3 sont les plus isolées en Algérie (**Ramdani-Bougessa**

et al., 2006 ; Touati et al., 2006; Touati et al., 2010 ; Touati et al., 2012 ; Nedjai et al. 2012 ; Iabadene et al., 2008 ; Messai et al., 2008).

Notre étude souligne, d'une part l'augmentation de la fréquence de la production de BLSE par les souches de *E.coli* isolées en Algérie, et d'autre part confirme la propagation mondiale du gène CTX-M-15 (**Carrer et al., 2011**).

Dans la présente étude, la diversité génétique des gènes BLSE est attribuée à des gènes déjà détectés (TEM-1, SHV-1, SHV-12, SHV-28), le gène TEM-1 a été décrit pour la première fois au début des années 1960 chez une seule souche de *E.coli* isolée d'une hémoculture d'un patient nommé « Temoniera » en Grèce (**Datta et al., 1965**). Depuis cette découverte, TEM-1 a propagé dans le monde entier, et il se trouve actuellement dans de nombreuses espèces bactériennes (**Patricia et Bradford., 2001**). En Algérie, le gène TEM-1 a été identifié dans : 2 souches de *Salmonella enterica* à Constantine en 2005. Une souche de *Salmonella enterica* isolée à l'hôpital de Drâa El Mizan (Tizi-Ouzou) en Janvier 2007, des souches de *K. pneumoniae* isolées dans 3 hôpitaux d'Alger en 2008. Deux souches : *Enterobacter cloacae* et *K.pneumoniae* isolées à Annaba en 2009 et 2 souches de *E. coli* isolées à l'hôpital central de l'armée (Alger) en 2009 (**Benslimani., 2009**).

Le gène SHV-1 a été décrit pour la première fois par **Pitton et al** en 1972 chez une souche de *K.pneumoniae* (**José et al., 2001**), depuis ce gène a été disséminé dans différentes parties du monde (**Harrif et al., 1997**). En Algérie, ce gène a été détecté chez une souche de *K.pneumoniae* isolée à Annaba en 2009 (**Benslimani., 2009**).

SHV-28 a été détecté dans plusieurs pays tel que la Chine par (**Wang et al., 2012**), Néanmoins, la BLSE SHV-12 a été déjà mise en évidence dans notre pays, par beaucoup de travaux, chez les espèces *K. pneumoniae* (**Berrazeg et al., 2013**), et *E. cloacae* (**Iabadene et al., 2008 ; Labid et al., 2014**).

La recherche moléculaire du support génétique de la résistance associée aux β -lactamines a permis de détecter la présence du gène *aadA2* qui code pour la résistance aux aminosides chez les 3 souches de *E.coli* résistantes à l'imipénème, ce dernier a été récemment détecté chez des souches de *P.aeruginosa* à Tlemcen, Algérie (**Sefraoui et al., 2013**).

Le développement de la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques peut sérieusement compromettre l'utilisation clinique des aminosides ou les quinolones combinés avec les β -lactamines pour traiter les infections dues aux bactéries à Gram négatif (**Hidalgo et al., 2013**). Ainsi, un traitement efficace doit être sélectionné en fonction de l'antibiogramme afin de limiter l'utilisation des carbapénèmes lorsque cela est possible. En effet, les carbapénèmes sont des β -lactamines qui sont souvent utilisés comme antibiotique de dernier recours pour

traiter les infections dûes aux BGN multirésistants. Ils sont aussi stables, même en présence des BLSE, cependant, cela a changé au cours des dernières années avec l'émergence des bactéries résistantes aux carbapénèmes qui sont soit des entérobactéries ou des bacilles non fermentaires (*A.baumannii* et *P. aeruginosa*) (**Jesudason et al., 2005**).

- **Production de carbapénémases**

Dans notre recherche bibliographique, nous avons remarqué qu'il y avait très peu de données disponibles sur la résistance de *E.coli* aux carbapénèmes en Afrique du nord, notamment en Algérie.

Les carbapénémases sont devenus une préoccupation majeure à travers le monde (**Carmeli et al., 2010 ; Cornaglia et al., 2011**) en raison de leur association à la résistance aux β -lactamines et à d'autres classes d'antibiotiques tels que les aminosides, les fluoroquinolones, et le cotrimoxazole (**Souli et al., 2008**). Ainsi, ils réduisent la possibilité de traiter les infections dûes à des souches multirésistantes (**Giamarellou et Poulakou., 2009**).

La première description des carbapénémases (NmcA) produites par les entérobactéries était en 1993 (**Naas et Nordmann., 1994**). Depuis, de grandes variétés de carbapénémases appartenant aux trois classes moléculaires d'Amber : classe A, B, et D ont été identifiés (**Queenan et Bush., 2007**) et elles ont émergé et diffusé dans différentes parties du monde (**Nordmann et al., 2011 ; Giamarellou et Poulakou., 2009 ; Walsh ., 2010**). Ces enzymes peuvent être localisés soit sur le chromosome ou acquises par des plasmides (**Nahid et al., 2013**).

Les carbapénémases de la classe B, sont des métallo- β -lactamases (MBL) de type VIM et IMP et plus récemment, la *New Delhi metallo-beta-lactamase-1* (NDM-1) (**Queenan et Bush., 2007 ; Walsh et al., 2005**).

En 2009 la *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM) a été décrite chez un patient suédois d'origine indienne, qui a voyagé à New Delhi (Inde) et a acquis une infection des voies urinaires due à une *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes et à tous les autres antibiotiques sauf la colistine (**Yong et al., 2009**). Les échantillons fécaux prélevés de ce patient ont présenté aussi une *E.coli* porteuse du même gène, qui est situé sur 2 grands plasmides (un plasmide de 180 kb pour *K. pneumoniae* et un plasmide de 140 kb pour *E. coli*) qui sont facilement transférables avec haute fréquence à *E. coli* J53 sensible (**Yong et al., 2009**). Ces plasmides abritent aussi des gènes de résistance à tous les autres antibiotiques, pour cela la diffusion rapide de ces bactéries présente une menace pour la thérapie et la santé des populations (**Rolain et al., 2010**). Suite à cette première découverte, plusieurs cas

d'infections causées par des bactéries productrices du gène NDM-1 ont été rapportés, y compris une souche de *E.coli* isolée à partir d'hémoculture d'un patient d'origine indienne au Royaume-Uni (**Muir et al., 2010**), trois cas d'entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*) ont été isolés aux États-Unis à partir des patients ayant reçu des soins en Inde (**Rolain et al., 2010**), et trois cas d'*A.baumannii* à New Delhi (**Karthikeyan et al., 2010**). En août 2010, une publication dans la revue « The Lancet: maladies infectieuses » faite par une équipe multinationale, a signalé l'émergence et la propagation de 180 cas des patients infectés par des bactéries portant le gène NDM-1, y compris 37 cas au Royaume-Uni et 143 cas au Pakistan et en Inde (**Kumarasamy et al., 2010**). Cette découverte a alerté la communauté médicale et scientifique internationale et secoué les autorités de santé publique (**Rolain et al., 2010**). En effet, suite à cette publication, la propagation et la diffusion de ce gène a eu lieu, avec plusieurs cas épidémiques ou sporadiques signalés dans d'autres pays dans tous les continents où des éclosions nosocomiales et communautaires ont été rapportées à travers le monde (**Rolain et al., 2010**), y compris les Etats-Unis et le Canada, l'Europe (Suède, le Royaume-Uni, l'Autriche, Belgique, France, Pays-Bas et l'Allemagne), le Japon, l'Afrique, Oman et l'Australie (**Poirel et al., 2010 ; Peirano et al., 2010**), dont la plupart des foyers indiqués ont un lien avec le sous-continent indien et dans certains cas, avec les pays des Balkans (**Livermore et al., 2011**), et le Moyen-Orient (**Poirel et al., 2011**). En plus de ces infections humaines, une étude a également démontré la présence de bactéries porteuses du gène NDM-1 dans des échantillons environnementaux prélevés à New Delhi en Inde (**Walsh et al., 2011**).

En Afrique le gène NDM-1 a été décrit en Libye (**Hammerum et al., 2012**), au Maroc (**Poirel et al., 2011**), la Tunisie (**Ben et al., 2013**) et l'Afrique du Sud (**Brink et al., 2012**). A ce jour, seize variants du gène NDM (NDM-1 à NDM-16) ont été rapportés (**Yousfi et al., 2015**). Contrairement à d'autres pays du monde, où le gène NDM a été identifié principalement chez les entérobactéries; en Algérie ce gène a été rapporté uniquement chez *A.baumannii* provenant des prélèvements cliniques (**Boulanger et al., 2012 ; Mesli et al., 2011**). Cependant, aucun rapport n'est disponible sur des souches de *E.coli* productrices du gène NDM en Algérie.

Dans cette étude, nous avons signalé, pour la première fois en Algérie et au continent Africain la présence du gène NDM-5 dans 3 souches de *E.coli* isolées à partir des prélèvements urinaires de 2 patients externes âgés de 63 et 75 ans, et une hémoculture d'un nourrisson hospitalisé en service de pédiatrie âgé de 5 mois. Ces prélèvements ont été pratiqués à l'hôpital

Dorban à Annaba- Algérie durant la période novembre 2012 et janvier 2013 (**Sassi et al., 2014**).

La première découverte du variant NDM-5 a été signalée en Septembre 2011 en Royaume-Uni à partir d'une souche de *E.coli* isolée des prélèvements (périnée et gorge) d'un patient, avec une histoire récente d'hospitalisation en Inde (**Hornsey et al., 2011**).

Au meilleur de nos connaissances, nous rapportons la deuxième découverte de ce gène mondialement, depuis, notre étude, 12 rapports de ce variant NDM, isolés à partir des échantillons cliniques ont été également signalés dans le monde (**Yousfi et al., 2015**).

En plus des prélèvements humains et environnementaux, les souches productrices des carbapénémases ont été isolées aussi à partir des animaux (**Yousfi et al., 2015**), en Septembre 2015, une étude à Béjaia, Algérie a déclaré la présence du gène NDM-5 chez une souche de *E.coli* isolée à partir d'un prélèvement rectal d'un chien (**Yousfi et al., 2015**). Ce qui présente le premier rapport de *E.coli* productrice du gène NDM-5 isolé à partir des animaux de compagnie dans le monde. En outre, les autres types de carbapénémases ont été signalés chez les animaux domestiques, y compris une *E. coli* multirésistante porteuse du gène NDM-1 récupérée à partir des animaux domestiques aux Etats-Unis (**Shaheen et al., 2013**), et deux souches de *K.pneumoniae* et *E. coli* productrices du gène OXA-48 obtenus à partir d'un chien en Allemagne (**Stolle et al., 2013**). Le gène OXA-48 a été détecté aussi à Béjaia (Algérie), dans 4 souches de *E. coli* isolées à partir des animaux de compagnie (**Yousfi et al., 2016**).

Le réservoir du gène NDM-5 en Algérie est inconnu, mais plusieurs sources de contamination peuvent être incriminées : diverses structures génétiques mobiles tel que (les séquences d'insertion, les intégrons, et les transposons) peuvent jouer un rôle important dans le transfert horizontal du gène NDM entre les différentes espèces de bactéries, telles que de *Acinetobacter* spp à *E.coli* (**Nordmann et al., 2012**), sachant que, la première découverte de ce gène en Algérie a été détecté chez *A. baumannii* (**Boulanger et al., 2012 ; Mesli et al., 2011**), après, elle a été signalée chez *E. coli* (**Sassi et al., 2014**). Il faut noter que, les voyageurs contribuent d'une manière significative au mouvement mondial des bactéries et des gènes de résistance (**Wilson et al., 2012**), pour cela la transmission du gène NDM a eu lieu dans de nombreux pays du monde dont le premier rapport du gène NDM-5a été en Royaume-Uni, après, il a été déclaré en Algérie à Annaba à partir des prélèvements humains (**Sassi et al., 2014**) et un an après, à Béjaia à partir d'un prélèvement rectal d'un chien (**Yousfi et al., 2015**). L'utilisation massive des antibiotiques dans le domaine vétérinaire peut causer l'apparition des gènes de résistance chez les animaux infectés et le transfert de ces gènes aux humains qui sont en contact direct avec ces derniers (**Lloyd., 2007**). Une étude récente a

montré aussi la présence du gène NDM chez des souches isolées à partir des aliments d'origine animale qui peuvent être ainsi transférer aux humains avec la chaîne alimentaire **(Wang et al., 2012)**. « Puisque notre étude a été la première qui a déclaré la présence du gène NDM-5 en Algérie, nous suggérons que : la contamination a été des humains vers les animaux ». Récemment, le gène NDM a été trouvé chez plusieurs espèces bactériennes isolées à partir de l'eau infiltrée, ce qui implique la large dissémination de ce gène **(Walsh et al., 2011)**. En plus, ces bactéries peuvent coloniser les intestins des patients, sans l'apparition des symptômes cliniques, suggérant la possibilité de la transmission du gène NDM par la voie fécale/orale, où cette flore fécale peut servir comme un réservoir de la dissémination du gène NDM dans le monde **(Kumarasamy et al., 2010 ; D'Andrea et al., 2011 ; Walsh et al., 2011)**.

La dissémination de ces bacilles multirésistants peut impliquer l'association de plusieurs mécanismes, tel que la propagation de souches épidémiques ou gènes de résistance. Les investigations concernant cette dissémination nécessitent une compréhension des mécanismes et les risques potentiels qui s'y rapportent. Le transfert des gènes de résistances par conjugaison, implique des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, ceux-ci, peuvent facilement dupliquer et se propager rapidement parmi différentes espèces bactériennes par transfert horizontal, ce qui représente un grand risque avec des conséquences significatives environnementales **(Pai et al., 2004)**.

- **Conjugaison bactérienne et transfert des gènes de résistance**

Dans la suite de cette étude, notre attention s'est portée surtout, sur les 3 souches de *E.coli* porteuses du gène *bla_{NDM-5}* qui sont donc les souches résistantes aux carbapénèmes et aux aminosides.

Dans nos transconjugants, nous avons constaté la présence simultanée du gène *aadA2* qui code pour la résistance élevée à tous les aminosides, le gène *bla_{TEM}* qui code pour une BLSE en plus du gène *bla_{NDM-5}* qui porte la résistance aux carbapénèmes, dont la PCR du gène *bla_{CTX-M}* était négative, ce qui suggère que les 3 gènes (*bla_{NDM-5}*, *bla_{TEM}*, *aadA2*) soient portés par un même plasmide conjugatif et multirésistant, représentant ainsi un mode de diffusion efficace de plusieurs mécanismes associés **(Leotard et Negrin, 2010)**. Nos résultats sont différents par rapport à ceux rapportés à partir d'une *E.coli* d'origine animale à Béjaia **(Yousfi et al., 2015)**, où le gène *bla_{NDM-5}* n'a pas été transféré aux transconjugants, suggérant ainsi la possibilité d'intégration de ce gène dans le chromosome **(Yousfi et al., 2015)**.

Dans notre étude, il n'y a pas eu lieu du transfert du gène *bla*_{CTX-M}. Cela peut être expliqué par le fait que les plasmides portant ce gène ne soient pas conjugatifs. En effet, même si, dans la majorité des cas, le gène *bla*_{CTX-M} est porté par un plasmide conjugatif, certains plasmides portant ce même gène ne sont pas transférables (**Walther-Rasmussen et Høiby., 2004**).

- **Relation clonale entre les souches de *E.coli***

L'étude de la relation clonale entre les 30 souches de *E.coli* BLSE⁺ en plus des 3 souches de *E.coli* productrices de carbapénémase a été réalisée en utilisant la technique génotypique : *multi-locus sequence typing* (MLST). Cette dernière a révélé que les souches étudiées appartenaient à 20 différents clones ou séquences types (ST) dont 4 ST sont déjà connues en Algérie (ST405, ST2, ST131 et ST617), et ils étaient détecté par (**Alouache et al., 2014 ; Zenati et al., 2016 ; Agabou et al., 2014 ; Alouache et al., 2014**) respectivement. Les 16 ST restantes (922, 925, 38, 2659, 2662, 959, 702, 167, 2115, 162, 224, 3502, 1196, 155, 1308), sont d'apparitions nouvelles en Algérie, mais elles étaient détecté dans d'autres pays du monde tels que : ST38, en Royaume- Uni par (**Chattaway et al., 2014**), ST167, au Danemark par (**Kaas et al., 2012**), ST1196 en Allemagne par (**Stolle et al., 2013**).

En ce qui concerne les 3 souches de *E.coli* résistantes aux carbapénèmes ; elles se sont avérées qu'elles appartiennent à la séquence type ST 2659. Cette dernière a été rapportée une seule fois avant notre recherche, chez *E.coli* isolée à partir des selles d'un chat domestique. Notre ST est différente de ST 648 rapportée d'une souche de *E.coli* porteuse du gène *bla*_{NDM-5} isolée en Royaume- Uni (**Hornsey et al., 2011**), et a ST 1284 isolée d'une souche de *E.coli* NDM-5 obtenue à partir d'un prélèvement rectal d'un chien à Béjaia-Algérie (**Yousfi et al., 2015**). Pour cela, nous rapportons pour la première fois au monde l'isolement de 3 souches de *E.coli* NDM-5 ST 2659.

- **Phylogénie**

L'analyse de l'arbre phylogénétique a révélé la présence de 2 autres souches ST 2659 isolées au niveau du service de pédiatrie. Donc, dans notre étude nous avons identifié 5 souches de *E.coli* ST 2659 entre novembre 2012 et janvier 2013, dont 3 souches ont été isolées en pédiatrie (dans ce service une souche était porteuse du gène NDM-5), et 2 souches ont été isolées chez 2 patients externes (les 2 malades étaient porteurs d'une *E.coli* NDM-5 positive). Les 5 patients ont été infectés par le même clone de *E.coli* ST 2659 dans une courte durée, ce qui suggère une source commune d'infection nosocomiale en pédiatrie et de transmission dans

la population dont certaines souches ont acquis des gènes de résistance aux antibiotiques. La première souche a été obtenue à partir d'une urine d'un enfant de 4 ans et elle était porteuse d'une BLSE, la deuxième souche a été récupérée d'un prélèvement urinaire d'un nourrisson de 2 mois et elle était productrice d'une céphalosporinase à haut niveau associée à une BLSE, la troisième souche a été isolée à partir d'une hémoculture d'un enfant de 5 mois, cette dernière était porteuse du gène *bla*_{NDM-5}. La quatrième et la cinquième souches ont été isolées des 2 prélèvements urinaires des 2 patients ambulatoires âgés de 63 et 75 ans et ces souches sont porteuses aussi du gène *bla*_{NDM-5}.

Toutefois, en raison de la rareté des données cliniques disponibles concernant les souches isolées, aucune source d'infection n'a été trouvée.

Cette dissémination nosocomiale et communautaire peut être liée à la capacité de *E.coli* de survivre dans l'environnement et être une source de contamination (**Kramer et al., 2006**). De plus, les mains du personnel soignant servent de réservoirs pour la transmission de l'organisme et sont responsables de plusieurs épidémies hospitalières. En outre, les nouveau-nés sont particulièrement des hôtes sensibles en raison de leur système immunitaire immature et leurs faible poids à la naissance, en particulier lorsque les dispositifs invasifs sont utilisés tels que la sonde urinaire et le cathéter veineux central (**Bennet et al., 1985**). Pour cela la flore habituelle (sensible aux antibiotiques) des patients hospitalisés peut être remplacée par des souches résistantes aux antibiotiques qui sont présentes en milieu hospitalier au fil du temps (**Budak et al., 2014**), ce qui peut augmenter le risque d'acquisition d'une infection à bactéries multirésistantes et c'est le cas dans notre étude avec les souches de *E.coli* porteuses du gène NDM-5.

L'émergence d'un tel clone de bactéries multirésistantes, qui sont probablement responsables d'épidémies nosocomiales et communautaire est inquiétante.

A la fin, on peut conclure que les souches isolées dans cette étude durant la période (2012 – 2013), sont d'apparition récente en Algérie et dans tout le continent Africain. Ainsi, elles sont à considérer comme un problème émergent du fait de leur production de carbapénémase de type NDM, rendant difficile le traitement de ces patients.

PARTIE IV: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Ce travail prospective réalisé entre novembre 2012 et janvier 2013, avait pour objectif de définir le profil épidémiologique et moléculaire des souches de *E.coli* isolées des patients externes et hospitalisés aux différents services à l'Hôpital «Dorban» d'Annaba, Algérie, Cette étude est la première à notre connaissance qui a porté sur l'émergence des souches de *E.coli* résistantes aux antibiotiques dans la région d'Annaba jusque là relativement épargnée par ce phénomène.

Elle a révélé un taux élevé de fréquence des (80,95%) *E.coli* BLSE⁺ qui a exprimé également des résistances notamment aux aminosides et aux fluoroquinolones. La recherche moléculaire du support génétique de ces résistances a montré une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE de plus, elle confirme la propagation internationale du gène CTX-M-15 qui était hébergé par 93,33% des *E.coli*. Quant à la résistance aux aminosides, nous avons détecté la présence du gène aadA2 qui confère la résistance à tous les aminosides, et en ce qui concerne la résistance aux carbapénèmes, nous avons révélé pour la première fois en Algérie et au continent Africain, la présence du gène NDM-5 chez 3 souches de *E.coli*, rendant ainsi les options du traitement des infections causées par cette espèce bactérienne plus restreintes. De plus, la présence de ses déterminants de résistance sur un plasmide conjugatif, favorise leur mobilité et leur dissémination. En outre, en utilisant la technique du MLST afin de rechercher la relation clonale entre les souches de *E.coli* qui portent le gène NDM-5, nous avons pu identifier un clone ST2659 composé de 5 souches isolées chez les nouveaux nés au niveau du service de pédiatrie. Ce dernier représente le service qui a hébergé la majorité des souches de *E.coli* isolées dans cette étude.

En définitive, Notre étude a montré que la résistance aux carbapénèmes des souches de *E.coli*, commence à disséminer d'une façon rapide dans nos hôpitaux, en conséquence, les infections causées par ces bactéries productrices de carbapénémases entraînent de véritables situations d'impasse thérapeutique et sont directement responsables d'une surmortalité.

Cette étude attire aussi l'attention sur le risque d'émergence et de dissémination de carbapénémases qui représentent un problème mondial inquiétant et souligne la nécessité d'une surveillance adéquate des souches BMR dans les hôpitaux algériens en particulier, et dans les unités de soins intensifs et pédiatriques qui sont le plus souvent associés à un taux élevé de mortalité.

Perspectives

Conscience de leur entrée en milieu hospitalier, les producteurs des carbapénémases représentent une nouvelle menace majeure pour la santé publique. Ces souches nécessitent d'être rapidement et efficacement détectées afin de prendre au plus vite les mesures préventives et thérapeutiques appropriées vis-à-vis des patients qui les hébergent. Leur détection peut parfois se révéler difficile, mais les nouvelles techniques de Biologie moléculaire sont des outils puissants et robustes permettant leur détection et leur identification. Aussi, l'amélioration de la Microbiologie du laboratoire et de son interaction avec le management du patient sont également essentiels. Actuellement, il faut un intervalle d'au moins 48 heures pour découvrir les résultats du laboratoire du diagnostic clinique de l'infection du patient indiquant la sensibilité aux antibiotiques de l'isolat. Durant cet intervalle, le patient est traité de façon empirique en fonction des agents pathogènes probables et les taux locaux de résistance. Bien que cette stratégie améliore la couverture initiale, dont peut en bénéficier le patient, cela va potentiellement conduire à une utilisation prolongée et inutile des antibiotiques à large spectre ainsi l'augmentation de la sélection des bactéries résistantes. La situation serait améliorée si la Microbiologie pouvait être accélérée, l'identification des agents pathogènes et leur résistance aux antibiotiques en heures plutôt qu'en jours et sans la nécessité de la culture. Des Méthodes potentielles existent, y compris la spectrométrie de masse (MALDI-TOF), qui permet l'identification des micro-organismes, ainsi que la détection des gènes de résistance aux carbapénèmes dans une courte durée. Un tel développement permettrait de réduire les coûts des longs séjours d'hospitalisation et d'antibiothérapie et de limiter la sélection et la diffusion de bactéries hautement résistantes. Néanmoins, de grands défis restent à relever, en particulier le coût élevé de ces appareils.

La modulation des facteurs qui favorisent la propagation des producteurs des carbapénémases dans la communauté est difficile parce que ces facteurs sont multiples et sont associés à l'absence d'utilisation d'hygiène, la sur utilisation de médicaments antibactériens, et l'augmentation des voyages à travers le monde.

Par ailleurs, une surveillance régulière de l'épidémiologie des souches résistantes, une bonne pratique d'hygiène et l'isolement des patients porteurs de souches multi-résistantes pourraient arrêter les épidémies d'infections nosocomiales causées par ces bactéries dans nos hôpitaux. En Algérie, la prévalence de la résistance induite par les carbapénémases reste encore mal connue, vu l'absence d'un système de surveillance sanitaire pour ces enzymes. Il convient

Conclusion et perspectives

évidemment de tout mettre en œuvre pour mettre fin à cette situation. Pour cela, la synthèse et l'application rigoureuse de stratégies de dépistage et protocoles de maîtrise de la diffusion doivent être établies en urgence. Il convient également de limiter au maximum la pression de sélection et donc de maîtriser la prescription des carbapénèmes. Ceux d'autant qu'il n'existe actuellement pas de perspective proche de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques. Pour cela le développement de nouvelles molécules et de stratégie thérapeutique innovante doit être encouragée.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude, nous souhaitons donc avoir la possibilité de poursuivre nos travaux fondamentaux, dans le cadre d'une équipe de recherche de l'université ou de l'hôpital; afin de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques, et de parvenir à en maîtriser plus efficacement les conséquences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abraham, E.P., and Chain, E.** 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. **146** :837.
2. **Agabou A, Lezzar N, Ouchenane Z, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP, Pantel A.** 2016. Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **35**: 227-34.
3. **Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Sotto A, Lavigne JP.** 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **33**:1641-6.
4. **Ahmad W, Jamshed F, Ahmad W.** 2015. FREQUENCY OF *ESCHERICHIA COLI* IN PATIENTS WITH COMMUNITY ACQUIRED URINARY TRACT COMMONLY USED ANTI BACTERIALS. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. **2**:333-7.
5. **Akinduti PA, Aboderin BW, Oloyede R, Ogiogwa JI, Motayo BO, Ejilude O.** 2016. High-level Multi-Resistant and Virulent *Escherichia coli* in Abeokuta, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*. **37**:104-14.
6. **Alouache S, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, Torres C, Bakour R.** 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist*. **20**:30-8.
7. **Ambler, R.P.** 1980. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci*. **289**: 321-331.
8. **Anago E, Ayi-Fanou L, Akpovi CD, Hounkpe WB, Agassounon-Djikpo Tchibozo M, Bankole HS, Sanni A.** 2015 Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. **14**: 5-17.

Références bibliographiques

9. **Andersson, D. I., and D. Hughes.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**:260-71.

10. **Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al.** 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* **45**: 2723-5.

11. **Ankur Goyal, K.N. Prasad, Amit Prasad, Sapna Gupta, Ujjala Ghoshal & Archana Ayyagar.** 2009. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* and associated risk factor. *Indian J Med Res* **129** : pp 695-700.

12. **Ari, Richard d'. Sezonov, Guennadi.** 2008. Biologie et génétique d'*Escherichia coli* : les organismes modèles, Paris : Belin, DL, Belin sup Sciences. Biologie.

13. **Arlet, G., and Philippon, A.** 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab.* **352** : 41-55.

14. **Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P.** 2005. Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* **11**:260–4.

15. **Avril J. M., Dabernat H. et Monteil D. H.** 2000. Bactériologie clinique. 3ème Ed. Ed Ellepses. Paris. 602 P

16. **Baba Ahmed-Kazi, T. Z., D. Decre, N. Genel, Z. Boucherit-Otmani, G. Arlet, and M. Drissi.** 2013. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug Resist.* **19**: 185-90

17. **Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait Ameer A, Haouchine D, Sahli F, Rolain JM.** 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J. Med. Microbiol.* **61**:1341–1343.

Références bibliographiques

- 18. Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain JM.** 2014. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect.* **8**:34-6.
- 19. Bandoh, K., Muto, Y., Watanabe, K., Katoh, N., and Ueno, K.** 1991. Biochemical properties and purification of metallo-B-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 371-372.
- 20. Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Bourjilat, F., Haouzane, F., Zerouali, K., and Timinouni, M.** 2011. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from community in Morocco. *J Med Microbiol.* **60**: 1344-1352.
- 21. Barguigua. A., F. El Otmani, F. L. El Yaagoubi, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni.** 2013. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco, *APMIS.* **121** : 675– 677.
- 22. Barguigua. A., F. El Otmani, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni.** 2012. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in the Moroccan community. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.* **73** : 290–291.
- 23. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A.** 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC inductible plasmidique β -lactamase (DHA-1) avec un *ampR* gène de *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2352-2358.
- 24. Barrial, K., and Scotet, J.** 2006. Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. *Perspective d'évolution. Tigaud de bactériologie.* **3** :10.
- 25. Bebrone, C.** 2007. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* **74**: 1686-701.
- 26. Belbel, Z., H. Chettibi, M. Dekhil, A. Ladjama, S. Nedjai, and J. M. Rolain.** 2014. Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microb. Drug Resist.* **20**: 310-315.

Références bibliographiques

27. **Belmonte O., Drouet D., Alba J., Moiton M-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C. et Jaffar-Bandjee M-C.** 2010. Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des beta-lactamases à spectre élargi. *Pathologie Biologie*. **58** : 18-24.
28. **Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JDD, Quentin C, Calbo ES, et al. A.** 2009. Multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. **49**: 682-690.
29. **Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, et al.** 2006. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. **42**:925-934.
30. **Benamrouche N., Hadjila L. et Rahal K.** 2009. Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries résistantes en Algérie. Revue bibliographique. In : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11eme rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). 198P.
31. **Ben, N. A., D. Decre, F. Compain, N. Genel, F. Barguellil, and G. Arlet.** 2013. Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob.Agents Chemother*. **57**: 4089-90
32. **Bennet, R., M. Eriksson, B. Melen, and R. Zetterstrom.** 1985. Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. *Acta Paediatr.Scand*. **74**: 687-690.
33. **Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl **1**:S347-57.
34. **Benouda. A. O. Touzani, M.-T. Khairallah, G. F. Araj, and G. M.Matar.** 2010. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **104**: 327–330- 2010.

Références bibliographiques

- 35. Benslimani A.** 2009. MRSA, entérobactéries BLSE, *Acinetobacter* spp. et *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. In : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11ème rapport d'évaluation (Janvier à Décembre 2009). 198P.
- 36. Berrazeg, M., Drissi, M., Medjahed, L., and Rolain, J.M.** 2013. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. J. Med. Microbiol. **62**: 864-74.
- 37. Bidet P. et Bingen E.** 2007. Enterobacteriaceae. In : **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris. **P** : 295-322.
- 38. Birkett, C. I., H. A. Ludlam, N. Woodford, D. F. Brown, N. M. Brown, M. T. Roberts, N. Milner, and M. D. Curran.** 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. J. Med. Microbiol. **56**: 52-55.
- 39. Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Motoa G, Pallares CJ, Rosso F, Matta L, Celis Y, Garzon M, Villegas MV.** 2016. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-onset urinary tract infections in Colombia. Enferm Infecc Microbiol Clin. pii: S0213-005X(15)00455-3.
- 40. Bonacorsi, S., and E. Bingen.** 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. Int J Med Microbiol **295**: 373-81.
- 41. Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 1–14.
- 42. Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., and Sirot, J.** 2000b. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 1936–1942.

Références bibliographiques

- 43. Boulanger, A., T. Naas, N. Fortineau, S. Figueiredo, and P. Nordmann.** 2012. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56** : 2214–2215.
- 44. Bouzenoune F., Boudersa F., Bensaad A., Harkat F. et Siad N.** 2009. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et maladies infectieuses*; **39**:142-143.
- 45. Bradford, P.A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. **14**: 933-51.
- 46. Brenner, D. J. and S. J. T. G. Krieg N R.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Seconde Edition.
- 47. Brink, A. J., J. Coetzee, C. G. Clay, S. Sithole, G. A. Richards, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2012. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J.Clin.Microbiol*. **50**:525-527.
- 48. Brisse, S., and Verhoef, J.** 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*. **51**: 915-924.
- 49. Brykier, A.** 1999. Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses Ed. Paris. 747.
- 50. Budak S, Oncul O, Aktas Z, Acar A, Ozyurt M, Turhan V, Erdem H, Gorenk L.** 2014. The determination of carbapenem resistance in *Escherichia coli* and *Pneumoniae* isolates related to nosocomial infections and the evaluation of risk factors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **45**:113-22.
- 51. Bush, K.** 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. **32**: 1085-1089.

Références bibliographiques

- 52. Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A.** 1995. A functional classification scheme for Blactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1211-1233.
- 53. Cantas L, Suer K, Guler E, Imir T.** 2016. High Emergence of ESBL-Producing *E. coli* Cystitis: Time to Get Smarter in Cyprus. *Front Microbiol.* **6**:1446.
- 54. Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin.Microbiol.Infect.* **1**:144-153.
- 55. Campos, L. C., M. R. Franzolin, and L. R. Trabulsi.** 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**:545-52.
- 56. Carbonne. A, J.M.Thiolet, S. Fournier et al.** 2010. Control of amultihospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Eurosurveillance.* **15** : 48.
- 57. Carmeli .Y. M. Akova, G. Cornaglia et al.** 2010. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control, *Clinical Microbiology and Infection.* **16** : 102–111, 2010.
- 58. Carrer, A. and P. Nordmann.** 2011. CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL. *Pathol.Biol.Paris* **59**:e133-e135.
- 59. Carr'er . A, L. Poirel, H. Eraksoy, A. A. Cagatay, S. Badur, and P. Nordmann.** 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **52** : 2950–2954.
- 60. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M et al.** 2010. Spread of OXA-48- encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010. **54**: 1369-73.
- 61. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D et al.** 2011. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**: 1274-8.

Références bibliographiques

- 62. Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E.** 2004. Bêtalactamines. EMC Maladies infectieuses. **1**: 129-202.
- 63. Chand Wattala, Reena Raveendrana, Neeraj Goela, Jaswinder Kaur Oberoia, Brijendra Kumar Rao.** 2014. Ecology of blood stream infection and antibiotic resistance in intensive care unit at a tertiary care hospital in North India. *Indian J Infect Dis.* **18**: 245–251.
- 64. Chang YY, Chuang YC, Siu LK, Wu TL, Lin JC, Lu PL, Wang JT, Wang LS, Lin YT, Huang LJ, Fung CP.** 2015. Clinical features of patients with carbapenem nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in intensive care units: a nationwide multicenter study in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* **48**: 219-25.
- 65. Charlier, P., Coyette, J., Dehareng, D., Dive, G., Duez, C., Dusart, J., Fonzé, E., Fraipont, C., Frère, J.M., Galleni, M., Goffin, C., Joris, B., Lamotte-Brasseur, J., and Nguyen-Distèche, M.** 1998. Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Synthèse. médecine/sciences.* **14** : 544-555.
- 66. Chattaway MA, Jenkins C, Ciesielczuk H, Day M, DoNascimento V, Day M, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Schink AK, Wu G, Threlfall J, Woodward MJ, Coldham N, Kadlec K, Schwarz S, Dierikx C, Guerra B, Helmuth R, Mevius D, Woodford N, Wain J.** 2014. Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative *Escherichia coli* ST38 clone. *Emerg Infect Dis.* **20**:1935-7.
- 67. Chen, Y. H., P. R. Hsueh, R. E. Badal, S. P. Hawser, D. J. Hoban, S. K. Bouchillon, Y. Ni, and D. L. Paterson.** 2011. Antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region according to currently established susceptibility interpretive criteria. *J. Infect.* **62**:280-291.
- 68. Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, et D. B. Gordon.** 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**:1584-6.
- 69. Clive P Page.** 1999. Pharmacologie intégrée, De Boeck Supérieur.

Références bibliographiques

- 70. Coimbra, R. S., F. Grimont, P. Lenormand, P. Burguiere, L. Beutin, and P. A. Grimont.** 2000. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res Microbiol* **151**:639-54.
- 71. Colodner, R., R. Raz, B. Chazan, and W. Sakran.** 2004. Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int.J.Antimicrob.Agents* **24**:409-410.
- 72. Coque, T., Baquerot, F., and Canton, R.** 2008. Increasing prevalence of ESBL – producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*. **13**: 1–11.
- 73. Cornaglia, G. H. Giamarellou, and G.M. Rossolini.** 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet Infectious Diseases*. **11** : 381–393, 2011.
- 74. Croxen, M. A., and B. B. Finlay.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:26-38.
- 75. Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, Dortet L, Naas T.** 2015. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. **46**:725-7.
- 76. Cuzon. G, T. Naas, H. Truong et al.** 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase blaKPC-2 Gene, *Emerging Infectious Diseases*. **16** : 1349–1356.
- 77. D’Andrea MM, Venturelli C, Giani T, Arena F, Conte V, et al.** 2011. Persistent carriage and infection by multiresistant *Escherichia coli* ST405 producing the NDM-1 carbapenemase: a report on the first Italian cases. *J Clin Microbiol* **49**: 2755–2758.
- 78. Datta N, Kontomichalou P.** 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. **208**:239–244.
- 79. Dbaibo, G.S.** 2000. Old and new targets of antibacterial therapy. *Leb Med J*. **48**: 177-181.

Références bibliographiques

- 80. Decousser, J.W., Poirel, L., and Nordmann, P.** 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**: 3595-3598.
- 81. de Oliveira, G. D., Y. Doi, D. Szabo, J. M. Adams-Haduch, T. M. Vaz, D. Leite, M. C. Padoveze, M. P. Freire, F. P. Silveira, and D. L. Paterson.** 2008. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:1790-1793.
- 82. Denton M.** 2007. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 May;29 Suppl 3:S9-S22. Review. Erratum in: *Int J Antimicrob Agents.* **6**:568.
- 83. Deshpande. L. M, P. R. Rhomberg,H. S. Sader, and R. N. Jones.** 2006. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005), *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **56** : 367–372.
- 84. Djahmi N, Duniach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP.**2014. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int.* **2014** :305784
- 85. Djahmi, N., N. Messad, S. Nedjai, A. Moussaoui, D. Mazouz, J. L. Richard, A. Sotto, and J. P. Lavigne.** 2013. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian University Hospital. *Clin.Microbiol.Infect.* **19**: E398-E404.
- 86. Diene, S. M., N. Bruder, D. Raoult, and J. M. Rolain.** 2011. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int.J.Antimicrob.Agents* **37**:544-546.
- 87. Doit C., Mariani-Kurkdjian P. et Bingen E.** 2010. Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie.* **17**: S140 -S144.

Références bibliographiques

- 88. Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., and Jarlier, V.** 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. **14**: 90-103.
- 89. Drissi M, Poirel L, Mugnier PD, Baba AZ, Nordmann P.** 2010. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*. Algeria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **29**: 1457-8.
- 90. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, et al.** 2002. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive Care Med. **28**:1718-23.
- 91. Duval, V., Maiga, I., Maiga, A., Guillard, T., Brasme, L., Forte, D., Madoux, J., Vernet- Garnier, V., and De Champs, C.** 2009. High prevalence of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bamako. Mali. Antimicrob. Agents Chemother. **53**: 4957-4958.
- 92. Effler, E., M. Isaacson, L. Arntzen, R. Heenan, P. Canter, T. Barrett, L. Lee, C. Mambo, W. Levine, A. Zaidi, and P. M. Griffin.** 2001. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. Emerg Infect Dis **7**:812-9.
- 93. Elhani, D.** 2012. Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. Ann Biol Clin. **70** : 117-40.
- 94. Elhani, D., Bakir, L., and Aouni, M.** 2011. The changing epidemiology of extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Ann Biol Clin. **69**: 523-529.
- 95. Fan S, Wang J, Li Y, Li J.** 2016. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of ESBLs producers from pus in patients with abdominal trauma associated intra-abdominal infections. Eur J Trauma Emerg Surg.
- 96. Farrell DJ, Morissey I, De Rubeis D et al.** 2003. A UK multicentre study and the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. J Infect; **46**: 94-100.

Références bibliographiques

- 97. Faure S.** 2009. Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : Impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. Université Rennes de France. 190P.
- 98. Ferdosi-Shahandashti E, Javanian M, Moradian-Kouchaksaraei M, Yeganeh B, Bijani A, Motevaseli E, Moradian-Kouchaksaraei F.** 2015. Resistance patterns of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. *Caspian J Intern Med*.**6**:148-51.
- 99. Ferech, M., and Coenen, S.** 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother*. **58**: 401-407.
- 100. Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S.** 2005. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev*. **105**: 395-424.
- 101. Flandrois J. P.** 1997. Bactériologie médicale. Collection Azay Presse universitaire de Lyon. 174-180
- 102. Fleming A.** 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. Influenza*. *Bull World Health Organ* 2001; **79**:780-790.
- 103. Foley, S. L., Lynne, A. M. & Nayak, R.** 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* **9** : 430–440.
- 104. Fortineau, N., Poirel, L., and Nordmann, P.** 2001. plasmidique et inducible céphalosporinase DHA-2 de *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. **47**: 207-210.
- 105. Frasca D., Dahyot-Fizelier C. et Mimoz O.** 2008. La colistine en réanimation. *Réanimation*. **17**: 251-258.
- 106. Gaillot, O., Clément, C., Simonet, M., and Philippon, A.** 1997. Novel transférables β -lactame avec des caractéristiques de résistance céphalosporinase à *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother*. **39**: 85-87.

Références bibliographiques

- 107. Gandoura N. et Nedjai A.** 2008. Incidence de l'infection nosocomiale en pédiatrie dans la région de Bizert : résultats d'une surveillance de 03 mois. *Rev Tun Infectiol.* **3** : 11-20.
- 108. Gansmandel, T.** 2011. Etude épidémiologique des résistances d'*Escherichia coli* BLSE au centre hospitalier de Valenciennes en 2006. Université du droit et de la santé (Lille). thes. pharma. **145**: 2011LIL2E008
- 109. Ghuysen, J.M.** 1990. Membrane topology, structure, and functions of the penicillin-interactive proteins. *Biotechnol Appl Biochem.* **12**: 468-72.
- 110. Ghuysen, J.M.** 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* **45**: 37-67.
- 111. Giamarellou .H. and G. Poulakou.** 2009. Multidrug-resistant gramnegative infections: what are the treatment options? *Drugs.* **69** : 1879–1901, 2009.
- 112. Giani. T, A. Marchese, E. Coppo, V. Kroumova, and G. M. Rossolini.** 2012. VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **56** : 2216–2217.
- 113. Giraud-Morin C. et Fosse T.** 2008. Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007). *Pathologie Biologie.* **56** : 417-423.
- 114. Giske CG, Fröding I, Hasan CM et al.** 2012. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden and the UK. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 2735-8.
- 115. Giske CG, Gezeliu L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A.** 2011. sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011. **17**: 552-6.

Références bibliographiques

- 116. Gniadkowski, M.** 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin.Microbiol.Infect. **1**:11-32.
- 117. G´omez-Gil . M. R., J. R. Pa˜no-Pardo, M. P. Romero-G´omez et al.** 2010. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **65** : 2695–2697.
- 118. Gootz, T.D.** 1990. Discovery and development of new antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. **3**: 13-31.
- 119. Graffunder EM, Preston KE, Evans AM, Venezia RA.** 2005. Risk factors associated with extended-spectrum β -lactamaseproducing organisms at a tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother **56** : 139-45.
- 120. Grundmann. H, D. M. Livermore, C. G. Giske et al.** 2010. Carbapenem-non susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts, Eurosurveillance. **15** : 46.
- 121. Guy Leyral, Elisabeth V.** : microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaire. 4ème édition Reuil Malmaison : Doin, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine 2007 ; 290p (biosciences et techniques : science des aliments)
- 122. Hackenhaar AA, Albernaz EP.**2013. Prevalence and associated factors with hospitalization for treatment of urinary tract infection during pregnancy. Rev Bras Ginecol Obstet. **35**: 199–204.
- 123. Haeggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., and Brisse, S.** 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 2400-2408.
- 124. Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., and Akalin, H.E.** 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**: 1637-1644.
- 125. Hammerum. A. M, A. R. Larsen, F. Hansen et al.** 2012. Patients transferred from Libya toDenmark carriedOXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. NDM-1-

Références bibliographiques

producing *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,”
International Journal of Antimicrobial Agents. **40** : 191–192.

- 126. Hammond, D.S., Schooneveldt, J.M., Nimmo, G.R., Huygens, F., and Giffard, P.M.** 2005. *bla*SHV genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 256-263.
- 127. Hamza R., Blanco I., Kammoun H., Saidani B., Bokri M., Hassine J., Fersi M., Hanson, N.D.** 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? J Antimicrob Chemother. **52**: 2-4.
- 128. Hardman, J.G., and Limbird, L.E.** 1998. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9th edition. Nieuwegein, Pays-Bas, Mc Graw-Hill. 1069-1098.
- 129. Harif-Heraud Z, Arpin, C., Benliman, S., and Quentin, C.** 1997. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4 producing strain of *Citrobacter diversus*. J Clin Microbiol. **35** : 2561-2567.
- 130. Hawkey, P. M. and A. M. Jones.** 2009. The changing epidemiology of resistance. J.Antimicrob.Chemother. **1**: i3-10.
- 131. Hays. C. Hays, A. Benouda, L. Poirel, M. Elouennass, and P. Nordmann.** 2012. Nosocomial occurrence of OXA-48-producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. International Journal of Antimicrobial Agents. **39** : 545–547.
- 132. Hennequin, C., Robin, F., Cabrol, N., Bonnet, R., and Forestier, C.** 2012. Characterization of a DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence. Antimicrob. Agents Chemother. **56**: 288-294.
- 133. Hibbert-Rogers, L. C., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, P. M. Hawkey, N. Todd, I. J. Lewis, and C. Bailey.** 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. J.Antimicrob.Chemother. **36**:65-82.

Références bibliographiques

- 134. Hidalgo, L., K. L. Hopkins, B. Gutierrez, C. M. Ovejero, S. Shukla, S. Douthwaite, K. N. Prasad, N. Woodford, and B. Gonzalez-Zorn.** 2013. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J.Antimicrob.Chemother.* **68** :1543-50
- 135. Hornsey M, Phee L, Wareham DW.**2011. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 **55**: 5952-4.
- 136. Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., and Philippon, A.** 2002. β - lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3045-9.
- 137. Iabadene, H., C. Dallenne, Y. Messai, D. Geneste, R. Bakour, and G. Arlet.** 2009. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**: 4043-4044.
- 138. Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bouguessa N., Lounes S., Bakour R. et Arlet G.** 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinantes in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **62**: 133-136.
- 139. Ito. H, Y. Arakawa, S. Ohsuka, R. Wacharotayankun, N. Kato, andM. Ohta.** 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene bla(IMP) among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **39** : 824–829.
- 140. Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A.** 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 1697-1704.
- 141. Jacoby, G.A., and Munoz-Price, L.S.** 2005. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* **352**: 380-391

Références bibliographiques

- 142. Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A.** 1988. Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10**: 867–878.
- 143. Jaurin, B., and Grundstrom, T.** 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **78**: 4897-4901.
- 144. Jesudason .M. V, A. J. Kandathil, and V. Balaji.** 2005. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo- β -lactamase production in clinical isolates. *Indian Journal of Medical Research.* **121** : 780–783, 2005.
- 145. Jesu's Oteo, Carmen Navarro, Emilia Cercenado, Alberto Delgado-Iribarren, Isabel Wilhelmi, Beatriz Orden, Carmen Garcí'a, Silvia Miguelan~ez, Mari'a Pe' rez-Va' zquez, Silvia Garcí'a-Cobos, Bele'n Aracil, Vero'nica Bautista, and Jose' Campos.** 2006. Spread of *Escherichia coli* Strains with High-Level Cefotaxime and Ceftazidime Resistance between the Community, Long-Term Care Facilities, and Hospital Institutions. *J. Clin. Microbiol.* **7** : 2359-2366
- 146. Johnson JR.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* **4** :80-128.
- 147. Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2005c. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**:383-404.
- 148. Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2002. Uropathogenic *Escherichia coli* as Agents of Diverse Non-Urinary Tract Extraintestinal Infections. *J. Infect. Dis.* **186**:859-864.
- 149. Joly B. et Reynaud A.** (2002). Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356P.
- 150. José Chaves,^{1,2} Margarita G. Ladona,^{1,*} Concepción Segura,³ Amparo Coira,² Roser Reig,² and Coral Ampurdanés¹.** 2001. SHV-1 β -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*[†] *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2856–2861.

Références bibliographiques

- 151. Kaas RS, Friis C, Ussery DW, Aarestrup FM.** 2012. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. BMC Genomics. **13**:577.
- 152. Kado, C.I., and Liu, S.T.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. **145**: 1365–1373.
- 153. Kardos, N., Demain A. L.** 2013. Ernst Chain: a great man of science. Appl Microbiol Biotechnol. **97**: 6613-6622.
- 154. Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. **2**:123-140.
- 155. Kariuki, S., G. Revathi, J. Corkill, J. Kiiru, J. Mwituria, N. Mirza, and C. A. Hart.** 2007. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. J.Infect.Dev.Ctries. **1**: 257-262.
- 156. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P.** 2010. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. J Antimicrob Chemother. **65**: 2253–2254.
- 157. Kauffmann, F.** 1947. The serology of the *coli* group. J Immunol **57**:71-100.
- 158. Kaye, K., A. Harris, H. Gold, and Y. Carmeli.** 2000. Risk Factors for Recovery of Ampicillin-Sulbactam-Resistant *Escherichia coli* in Hospitalized Patients. Antimicrob Agents Chemother **44**:1004-1009.
- 159. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al.** 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. PLoS One.**7**: e31676.
- 160. Kempf M, Rolain JM.** Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe. 2012. clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents. **39**: 105-14.
- 161. Kim, J. Y., Y. J. Park, H. J. Kwon, K. Han, M. W. Kang, and G. J. Woo.** 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-

lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study.

J.Antimicrob.Chemother. **62**: 479-483.

162. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH and Kim EC. 2002.

Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome.

Antimicrob Agents Chemother. **46**: 1481-1491.

163. Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., and

Wiedermann, B. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. **28**: 302-307.

164. Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and Mitsuhashi, S. 1983.

Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. J Infect. **11**: 315-317.

165. Knox, J.R. 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases:

mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob. Agents

Chemother. **39**: 2593-2601.

166. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens

persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006 Aug;**6**:130. Review.

167. Ktari . S, G. Arlet, B. Mnif et al. 2006. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella*

pneumoniae isolates producing VIM-4 metallo- β -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase, and CMY-4 AmpC β -lactamase in a Tunisian University Hospital. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **50** : 4198–4201.

168. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR et al. 2010. Emergence of a new

antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. **10**: 597–602.

169. Kuzdan C, Soysal A, Culha G, Altinkanat G, Soyletir G, Bakir M. 2014. Three-

year study of health care-associated infections in a Turkish pediatric ward. J Infect Dev Ctries.**11**:1415-20.

Références bibliographiques

- 170. Labid, A., Gacemi-Kirane, D., Timinouni, M., Amoura, K., and Rolain, J.M.** 2014. High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* **8**: 947-954.
- 171. Lane, M. C., V. Lockatell, G. Monterosso, D. Lamphier, J. Weinert, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2005. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* **73**:7644-56.
- 172. Lartigue. M.-F, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2004. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an Enterobacteriaceae isolate in France,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **48** : 4929–4930.
- 173. Lavigne, J. P., H. Marchandin, J. Delmas, J. Moreau, N. Bouziges, E. Lecaillon, L. Cavalie, H. Jean-Pierre, R. Bonnet, and A. Sotto.** 2007. CTX-M β - lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, Molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol* **45**:620-6.
- 174. Le Noc, P.** 1999. Monobactames in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. 374-391.
- 175. Leotard S. et Negrin N.** 2010. Epidémiologie des entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu (E-BLSE) au centre hospitalier de Grasse (2005–2008). *Pathologie Biologie.* **58** : 35-38.
- 176. Levine, M. M., and R. Edelman.** 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**:31-51.
- 177. Levy, S. B.** 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found Symp* **207**:1-9.
- 178. Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., and Seibert, G.** 1991. Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of Cefquinome (HR111V), a new broad spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 14-19.

Références bibliographiques

- 179. Lloyd DH.** 2007. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. Clin Infect Dis. Review. **2**:S148-52.
- 180. Liu, W., Chen, L., Li, H., Duan, H., Zhang, Y., Liang, X., Li, X., Zou, M., Xu, L., and Hawkey, P.M.** 2009. Novel CTX-M (beta)-lactamase genotype distribution and spread into 73 multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China. J Antimicrob Chemother. **63**: 895-900.
- 181. Livermore, D.M.** 1995. "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. **8**: 557-584.
- 182. Livermore, D. M, T. R. Walsh, M. Toleman, and N. Woodford.** 2011. Balkan NDM-1: escape or transplant? The Lancet Infectious Diseases. **11** : 164.
- 183. Macgowan, A.P., Brown, H.M., Holt, H.A.** 1993. An eight-year survey of antimicrobial susceptibility patterns of 85,971 bacteria isolated from patients in a district general hospital and the local community. J Antimicrob Chemother **31**: 543-557.
- 184. Machado, J., F. Grimont, and P. A. Grimont.** 1998. Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. Res Microbiol **149**:119-35.
- 185. Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., and Frere, J.M.** 1999. The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. Nat Prod Rep. **16**: 1-19.
- 186. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frere, J.M.** 1998. Catalytic properties of class A betalactamases: efficiency and diversity. Biochem J. **330**: 581-598.
- 187. Matthew, M., Hedges, R.W., and Smith, J.T.** 1979. Types of β -lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. J Bacteriol. **138**: 657-662.
- 188. Matute A.J, Hak E., Schurink C. et al.** 2004. Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infection in Leon, Nicaragua. Int J Antimicrob Agents. **23**: 506-9.
- 189. Marianna Ofner-Agostini, Andrew Simor, Michael Mulvey, Alison McGeer, Zahir Hirji, Melissa McCracken , Denise Gravel , David Boyd , Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP), Elizabeth Bryce .** 2009.

Références bibliographiques

- Risk factors for and outcomes associated with clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species resistant to extended-spectrum cephalosporins among patients admitted to Canadian hospitals. Autumn. Can J Infect Dis Med Microbiol. **20** : 3.
- 190. Mary B Synnott, Dale L Morse, and Susan M Hall.** 1994. Neonatal meningitis in England and Wales: a review of routine national data Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. **71**: F75–F80.
- 191. Massova, I., and Mobashery, S.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillinbinding proteins and beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 1-17.
- 192. Mayoral G., Ferreyra M., Eden A., Gueudet P., Miquel C. et Lecaillon E.** 2010. Evolution of third generation cephalosporins resistance in Enterobacteriaceae from 2000 to 2008 in Perpignan hospital. Pathologie Biologie. **58**: 7-10.
- 193. Medeiros, A.A.** 1984. β -lactamases. Bnt. Med. Buli. **40**: 18-27.
- 194. Melano, R., A. Corso, A. Petroni, D. Centron, B. Orman, A. Pereyra, N. Moreno, and M. Galas.** 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. J.Antimicrob.Chemother. **52**:36-42.
- 195. Mendonça, N., Ferreira, E., Louro, D., Caniça, M., and ARSIP Participants.** 2009. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum β -lactamaseproducing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. Int J Antimicrob Agents. **34**: 29–37.
- 196. Mesli, E, M. Berrazeg, M. Drissi, S. N. Bekkhoucha, and J. M. Rolain.** 2011. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species, carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **55** : 4896–4899, 2011.
- 197. Messai Y., Benhassine T., Naim M., Paul G. et Bakour.** 2006. Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. Rev Esp Quimioterap. **19**: 144-151.

Références bibliographiques

- 198. Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G. et Bakour R.** 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*. **56** : 319–325.
- 199. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M et al.** 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. **16**: 112-22.
- 200. Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S. et Hammami A.** 2008. Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et maladies infectieuses*. **38** : 293-298.
- 201. Mokady, D., U. Gophna, and E. Z. Ron.** 2005. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **43**: 66-73.
- 202. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P.** 2010. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* .**16**: 35-40.
- 203. Muir A, Weinbren MJ.** 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase: a cautionary tale. *J Hosp Infect*. **75**: 239–240.
- 204. Mumtaz Ahmad Khan.**2012. Bacterial Spectrum and Susceptibility patterns of Pathogens in ICU and IMCU of a Secondary Care Hospital in Kingdom of Saudi Arabia. *International Journal of Pathology*. **10**: 64-70 64.
- 205. Naas .T and P. Nordmann.** 1994. Analysis of a carbapenemhydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91** : 7693–7697.
- 206. Naas. T, G. Cuzon, M.-V. Villegas, M.-F. Lartigue, J. P. Quinn, and P. Nordmann.** 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52** : 1257–1263.

Références bibliographiques

- 207. Nahid, F, A. A. Khan, S. Rehman, and R. Zahra.** 2013. Prevalence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multi-drug resistant bacteria at two Pakistani hospitals and implications for public health, *Journal of Infection and Public Health*. **6** : 487–493.
- 208. Naiemi, N.A., Duim, B., Savelkoul, P.H., Spanjaard, L., De Jonge, E., Bart, A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and de Jong, M.D.** 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*. **43**: 4862-4864.
- 209. Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., Hosaka, Y., and Inoue, M.** 2004. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**: 1151-1158.
- 210. Nanninga, N.** 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **5**: 791-795.
- 211. Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*. **11**:142-201.
- 212. Nedjai, S., A. Barguigua, N. Djahmi, L. Jamali, K. Zerouali, M. Dekhil, and M. Timinouni.** 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med.Mal Infect*. **42**: 20-29.
- 213. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al.** 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*; **61**: 273-81.
- 214. Nienke van de Sande-Bruinsma, Hajo Grundmann, Didier verloo, Edine Tiemersma, Jos Monen, Herman Goossens, Matus Ferech, and the European Antimicrobial Resistance Surveillance System and European surveillance of Antimicrobial Consumption Project Groups.** 2008. Antimicrobial Drug Use and Resistance in Europe. *Emerging infectious Diseases*.www.cdc.gov. **14** : 11.

Références bibliographiques

- 215. Noah Rosenblatt-Farrell.** 2009. The landscape of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect.* **6:** A244-A250.
- 216. Nordmann, P.** 1998. Trends in β -Lactam Resistance Among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* **27:**100-106.
- 217. Nordmann, P. and A. Carrer.** 2010. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Arch.Pediatr.* **4:** S154-S162.
- 218. Nordmann P, Carrer A.** 2010. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Arch Pediatr.***17:** S154-62.
- 219. Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* **9:** 228-36.
- 220. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel.** 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol.Med.* **18:**263-272.
- 221. Nordmann, P., L. Poirel, T. R. Walsh, and D. M. Livermore.** 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* **19:** 588-595.
- 222. Nordmann. P, T. Naas, and L. Poirel.** 2011. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases.* **17 :** 1791–1798.
- 223. Olowe, O.A., Grobbel, M., Büchter, B., Lübke-Becker, A., Fruth, A., and Wieler, L.H.** 2010. Detection of *bla*(CTX-M-15) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* from hospital patients in Nigeria. *Int J Antimicrob Agents.* **35:** 206 207.
- 224. Olson, A.B., Silverman, M., Boyd, D.A., McGeer, A., Willey, B.M., Pong-Porter, V., Daneman, N., and Mulvey, M.R.** 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera Georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49:** 2112-2115.
- 225. ORSKOV F., O. I.** 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* **14:** 43-112.

Références bibliographiques

- 226. Oteo . J, D. Saez, V. Bautista et al.** 2013. Spanish collaborating group for the antibiotic resistance surveillance program. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012, Antimicrob Agents Chemother. **57** : 6344–6347.
- 227. Overturf GD.** 2010. Carbapenemases: a brief review for pediatric infectious disease specialists. Pediatr Infect Dis J. **29**: 68–70.
- 228. Pai H., KangC. I., Byeon J. H., Lee K. D., Park W. B., Kim H. B., Kim E. C., Oh M. D. Choe K. W.** 2004. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents Chemother. **48**: 3720-3728.
- 229. Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev **33**:757-84.
- 230. Paterson, D.L., and Bonomo, R.A.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. **18**: 657-686.
- 231. Patricia A. Bradford*** . 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev. **14**: 933–951.
- 232. Péan Y., Goldstein F.W. et De Bels F.** 2001. Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. Méd Mal Infect. **31** : 609-21.
- 233. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Woodford N, Pitout JDD.** 2010. The characteristics of a metallo-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated in Canada from a patient with recent travel to India. Boston. **12** : 15. C1-675a.
- 234. Perez, F., Endimiani, A., Huje,r K.M., and Bonomo, R.A.** 2007. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. **7**: 459-469.
- 235. Perlemuter L., Perlemuter G.** 1993. Guide de thérapeutique, 4ème édition. Paris Masson, Juin 2007.

Références bibliographiques

- 236. Pitout JDD, François Lesesve.** 2008. Service d'hématologie Biologique. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **8**:159-166.
- 237. Pitton J S.** 1972. Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. *Rev Physiol.* **65**:15–93.
- 238. Philippon, A., and Arlet, G.** 2006. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin.* **64**: 37-51.
- 239. Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1-11.
- 240. Poirel, L., A. Benouda, C. Hays, and P. Nordmann.** 2011. Emergence of NDMproducing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J.Antimicrob.Chemother.* **66**: 2781-2783.
- 241. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann.** 2012. OXA-48-like carbapenemase: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **67** : 1597–1606.
- 242. Poirel, L., A. Ros, A. Carricajo et al.** 2011. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **55** : 447– 448, 2011.
- 243. Poirel, L., C. H´eritier, V. Tolˆun, and P. Nordmann.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **48** : 15–22.
- 244. Poirel, L., Kampfer, P., and Nordmann, P.** 2002. Chromosome-encoded Ambler A betalacatamse of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of CTX-M extended-spectrum betalacatamse. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 4038-4040.
- 245. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P.** 2010. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 4914-6
- 246. Poirel, L., Lebessi, E., Castro, M., Fèvre, C., Foustoukou, M., and Nordmann, P.** 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing

isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 2277-2279.

247. Poirel. L., M. O. Abdelaziz, S. Bernabeu, and P. Nordmann. 2013. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. International Journal of Antimicrobial Agents. **41** : 90–91.

248. Poirel. L., N. Fortineau, and P. Nordmann. 2011. International transfer of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **55** : 1821–1822.

249. Potron. A, L. Poirel, F. Bussy, and P. Nordmann. 2011. Occurrence of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene *bla*OXA-48 in the environment in Morocco. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **55** : 5413–5414.

250. Prescott, L. M., Klein D. A., and Harley J. P. 2010. Microbiologic 3e éd., De Boeck Université, Bruxelles, 1088 pages.

251. Queenan, A. M., and K. Bush. 2007. Carbapenemases: the versatile betalactamases. Clin. Microbiol. Rev. **20**: 440–458.

252. Quinteros, M., M. Radice, N. Gardella, M. M. Rodriguez, N. Costa, D. Korbenfeld, E. Couto, and G. Gutkind. 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:2864-2867.

253. Rahal, K., Belouni, R., and Benslimani, A. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Rec de L'OMS. 4ème édition. Algérie. **46** : 52.

254. Ramdani-Bouguesa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., and Canica, M. 2011. Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. J Med Microbiol. **60**: 983-987.

255. Richard C. 1994. A propos de la définition des Enterobactériaceae. Techniques et Biologie **4**: 96-103.

Références bibliographiques

- 256. Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R.** 2010. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 466-70.
- 257. Robin, F., Gibold, L., and Bonnet, R.** 2012. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires.* **445** : 47-58.
- 258. Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al.** 2008. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* **168**: 1897-1902.
- 259. Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, M. Cueto, J. Galvez, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2008. Risk-factors for emerging bloodstream infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **14**:180-3.
- 260. Rodriguez-Villalobos, H., and Struelens, M.J.** 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* **15**: 205–213.
- 261. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G.** 2010. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect.* **16**:1699-701.
- 262. Roschanski Nicole, Jennie Fischer, Beatriz Guerra, Uwe Roesler.** 2014. Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLoS One.* **9**: e100956.
- 263. Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753- 4.
- 264. Samanta, S., K. Farrer, A. Breathnach, and P. T. Heath.** 2011. Risk factors for late onset gram-negative infections: a case-control study. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **96**: F15-F18.

Références bibliographiques

265. **Sassi A, Loucif L, Gupta SK, Dekhil M, Chettibi H, Rolain JM.** 2014. NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**: 5606-8.
266. **Schroeder, W.A., Locke, T.R., and Jensen, S.E.** 2002. Resistance to beta-lactamase inhibitor protein does not parallel resistance to clavulanic acid in TEM beta-lactamase mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3568-3573.
267. **Schwaber, M.J, and Carmeli, Y.** 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* **60**: 913-920.
268. **Schwaber, M., S. Navon-Venezia, K. Kaye, R. Ben-Ami, D. Schwartz, and Y. Carmeli.** 2006. Clinical and Economic Impact of Bacteremia with Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1257-1262.
269. **Sefraoui, I., M. Berrazeg, M. Drissi, and J. M. Rolain.** 2013. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated from Western Algeria Between 2009 and 2012. *Microb.Drug Resist.* **20**: 156-61.
270. **Segagni Lusignani L, Blacky A, Starzengruber P, Diab-Elschahawi M, Wrba T, Presterl E.** 2016. A national point prevalence study on healthcare-associated infections and antimicrobial use in Austria. *Wien Klin Wochensh*
271. **Sekhsokh Y., Chadli M. et El Hamzaoui S.A.** 2008. Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecines et maladies infectieuses.* **38** :324-327.
272. **Seng, P., J. M. Rolain, P. E. Fournier, S. B. La, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future.Microbiol.* **5**:1733-1754
273. **Seniha Senbayrak Akcay, Asuman Inan, Simin Cevan, Ayse Nilufer Ozaydin, Naz Cobanoglu, Seyfi Celik Ozyurek, Sebahat Aksaray.** 2014. Gram-negative

Références bibliographiques

bacilli causing infections in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey. *J Infect Dev Ctries* 2014. **8**: 597-604.

- 274. Servin, A. L.** 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 264-92.
- 275. Shaheen BW, Nayak R, Boothe DM.** 2013. Emergence of a New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**: 2902-3.
- 276. Shu, J.C., Chia, J.H., Kuo, A.J., Su, L.H., and Wu, T.L.** 2010. A 7-year surveillance for ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a university hospital in Taiwan: the increase of CTX-M-15 in the ICU. *Epidemiol Infect.* **138**: 253-263.
- 277. Sievert, D. M., P. Ricks, J. R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan, A. Kallen, B. Limbago, and S. Fridkin.** 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **34**:1-14.
- 278. Simonet M., Berche P., Gaillard J.L.** Bactériologie : Bactériologie des infections humaines : Paris Flammarion Médecine science 1991 : 77-137
- 279. Snyder, L., and W. Champness.** 2007. 4th Edition, Molecular genetics of bacteria. Washington, D.C. ASM Press.
- 280. Somily AM, Habib HA, Absar MM, Arshad MZ, Manneh K, Al Subaie SS, Al Hedaithy MA, Sayyed SB, Shakoor Z, Murray TS.**2014. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *J Infect Dev Ctries.* **8**: 1129-36.
- 281. Souli .M. I. Galani, and H. Giamarellou.** 2008. Emergence of extensively drug resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveillance.* **13** : 47.

Références bibliographiques

- 282. Soussy, C. J.** 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. http://nosobase.chuliyon.fr/recommandations/sfm/2010_antibiotiques_casfm.pdf.
- 283. Stahl J.-P.** 2005. La tigécycline, un nouvel antibiotique à l'étude chez l'homme. *Médecine et maladies infectieuses*. **35**: 62–67.
- 284. Stenutz, R., A. Weintraub, and G. Widmalm.** 2006. The structures of *Escherichia coli* Opolysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* **30**:382-403.
- 285. Steven L. Chang, MD, Linda D. Shortliffe, MD*.** 2006. Pediatric Urinary Tract Infections. *Pediatr Clin N Am* **53** : 379– 400.
- 286. Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, et al.** 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother*. **68**: 2802–8.
- 287. Stratton, C.W.** 2000. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J*. **48**: 186-198.
- 288. Suarez S.** 2013. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de doctorat. Université Paris descartes.
- 289. Thomson, K.S., and Moland, E.S.** 2000: the new β -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect*. **2**: 1225–1235.
- 290. Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., and de Champs, C.** 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. **27**: 397-402.
- 291. Touati, A., L. Brasme, S. Benallaoua, A. Gharout, J. Madoux, and C. C. De.** 2008. First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis*. **60**: 287-290.

Références bibliographiques

- 292. Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., Brasme, L., and de Champs, C.** 2012. CTXM-15- producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni- Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol.* **3**: 181-185
- 293. Touati, A., Zenati, K., Brasme, L., Benallaoua, S., and de Champs, C.** 2010. Extended spectrum beta-lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect.* **75**: 78-79.
- 294. Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM.** 2013. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **5**: 2426-7.
- 295. Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain JM.** 2012. Emergence of blaOXA-23 and blaOXA-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* **40**: 89-91.
- 296. Tozzi, A. E., A. Caprioli, F. Minelli, A. Gianviti, L. De Petris, A. Edefonti, G. Montini, A. Ferretti, T. De Palo, M. Gaido, and G. Rizzoni.** 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis* **9**:106-8.
- 297. Van Bambeke F., Spiniwine A., Verbist L. et Tulkens P.M.** 2002. Les antibiotiques moins souvent et mieux: le rôle du pharmacien. Société scientifiques des pharmaciens francophones (SSPF). p 1-7.
- 298. Vander-Stichele, R.H., Elseviers, M.M., Ferech, M., Blot, S., Goossens, H., and European Surveillance of Antibiotic Consumption (ESAC) Project Group.** 2006. Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002). *J Antimicrob Chemother.* **58**: 159-167.
- 299. Vatopoulos. A.** 2008. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece- a review of the current evidence,” *Euro Surveillance.* **13** : 4.

Références bibliographiques

- 300. VERNOZY-ROZAND Christine, MONTET Marie-Pierre.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7 - 2e éd. Coll. Monographies de microbiologie.
- 301. Vranić . M. -Ladavac, B. Bedenić, F.Minandri et al.** 2014. Carbapenem resistance and acquired class D β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009–2010. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. **33** : 471–478.
- 302. Walther-Rasmussen J. et Hoiby N.** 2004. Cefotaximases (CTX-Mases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. Can J Microbiol. **50**: 137-65.
- 303. Walsh .T. R, “Emerging carbapenemases.** 2010. a global perspective, International Journal of Antimicrobial Agents. **3** : S8–S14.
- 304. Walsh, T. R., J. Weeks, D. M. Livermore, and M. A. Toleman.** 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect.Dis. **11**: 355-362.
- 305. Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2005. Metallobeta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. **18**: 306– 325.
- 306. Wang XR, Chen JC, Kang Y, Jiang N, An SC, Gao ZC.**2012. Prevalence and characterization of plasmid-mediated blaESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. Chin Med J (Engl). **125**: 894-900.
- 307. Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, He T, Ma L, Lai J, Shen Z, Liu Y, Shen J.** 2013. Identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. PLoS One. **5**: e37152.
- 308. Wilke, M.S., Lovering, A.L., and Strynadka, N.C.** 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Curr Opin Microbiol. **8**: 525-533.
- 309. Wilson, M. E. and L. H. Chen.** 2012. NDM-1 and the Role of Travel in Its Dissemination. Curr.Infect.Dis.Rep. **14**: 213-226.

Références bibliographiques

- 310. Woodford, N., P. M. Tierno, Jr., K. Young, L. Tysall, M. F. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, and D. M. Livermore.** 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4793-4799.
- 311. Wright, K. J., P. C. Seed, and S. J. Hultgren.** 2005. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun* **73**:7657-68.
- 312. Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa.** 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:53-56.
- 313. Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et Ouar Korich M.N.** 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
- 314. Yang LR, Peng MJ, Li H, Pang Y.** 2013. Pathogen distribution and risk factors of nosocomial infections in neonates in the neonatal intensive care unit. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. Chinese.* **2**:112-6.
- 315. Yigit, H, A. M. Queenan, G. J. Anderson et al.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **45** : 1151–1161.
- 316. Yong D, Lee K, Yum JH, et al.** 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* **40**: 3798-801.
- 317. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 5046–5054.
- 318. Yousfi M, Mairi A, Bakour S, Touati A, Hassissen L, Hadjadj L, Rolain JM.** 2015. First report of NDM-5-producing *Escherichia coli* ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. *New Microbes New Infect.* **8**:17-8.

Références bibliographiques

- 319. Yousfi M, Touati A, Mairi A, Brasme L, Gharout-Sait A, Guillard T, De Champs C.** 2016. Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microb Drug Resist.*
- 320. Zapun, A., C. Contreras-Martel, and T. Vernet.** 2008. Penicillin-binding proteins and betalactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**:361-85.
- 321. Zenati K, Touati A, Bakour S, Sahli F, Rolain JM.** 2016.Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. *J Hosp Infect.* **92**: 19-26
- 322. Zhanel G., Hisanaga T., Laing N. et al.** 2006. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* out patient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents.* **27**: 468–475.

Autres références

1. **Antimicrobial resistance global report on surveillance.** 2014. www.who.int
2. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe.** 2014.
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/.../antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>
3. **Détermination *in vitro* de la CMI (E-test).** 2014.
http://microcsb.net/IMG/pdf/cmi_e_test.pdf.
4. **L'Antibio-Résistance en Tunisie.** 2011.
www.infectiologie.org.tn/pdf/lart2011/lart_2011_complet.pdf
5. **National Healthcare Safety Network (NHSN).** 2014.
<http://www.cdc.gov/nhsn/dataStat.html>.
6. **OMS : Règlement sanitaire international : Flambées épidémiques d'infection à *E.coli* O104 :H4.** 30ème bulletin. 22/07/2011
7. **Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques.** 2012. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2011). <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>.

Webographie

1. <http://www.atcc.org>
2. <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. <http://www.eucast.org>
4. <http://www.lahey.org/studies/>
5. <http://www.mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>
6. <http://www.mlst.net>
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
8. <http://www.rbmc.qc.ca/reviews/>

RESUMES

Résumé

Escherichia coli est l'un des principaux agents pathogènes responsables des infections humaines. L'émergence de la résistance aux céphalosporines de troisième génération par la production des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a conduit à une utilisation accrue des carbapénèmes. L'incidence croissante de la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries est une préoccupation majeure dans le monde entier. Les producteurs des carbapénémases sont principalement identifiés chez *Klebsiella pneumoniae* et, dans une moindre mesure, chez *E. coli* et d'autres entérobactéries. Le but de cette étude était d'évaluer et de caractériser le support génétique de la résistance aux antibiotiques des souches de *E. coli* isolées à partir de différents services à l'hôpital universitaire de la ville d'Annaba entre 2012 et 2013. Dans cette étude, nous avons décrit pour la première fois, la détection du gène *bla*_{NDM-5} (New Delhi métallo- β lactamase) dans 3 isolats cliniques de *E. coli* en Algérie. Un total de 105 souches cliniques de *E. coli* consécutives et non duplicatives, ont été récupérés de patients hospitalisés et non hospitalisés à l'hôpital universitaire « Dorban » d'Annaba, en Algérie, entre Janvier 2012 et Février 2013. Notre étude a montré que sur un total de 105 souches de *E.coli* testées, 85 (80,95%) d'entre elles sont BLSE+, 20 souches (19,04%) sont productrices de BLSE et CHN, et parmi ces dernières, 3 souches (Ec 37, Ec 40, Ec 70) en l'occurrence sont productrices de carbapénémases et hébergent le gène *bla*_{NDM-5}. La première a été isolée à partir du sang d'un enfant de 5 mois, hospitalisé au service de pédiatrie, tandis que les deux autres ont été retrouvées dans des prélèvements urinaires chez deux patients âgés de 63 et 75 ans. D'abord, l'identification des 105 souches de *E. coli* a été réalisée par l'API 20E et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, les tests de sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion des disques sur gélose et CMI par E. Test) ont été réalisés selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie. L'activité des carbapénémases a été déterminée en utilisant le test de Hodge modifié et les tests d'approximation de disque à l'aide de l'EDTA, et a également été confirmée par le test récemment décrit « MALDI TOF-MS carbapenemase ». En outre, les gènes de résistance aux antibiotiques ont été caractérisés par des techniques de Biologie moléculaire (PCR et séquençage). Par ailleurs, la transférabilité des déterminants de la résistance a été testée par des expériences de conjugaison en

utilisant *E. coli* J53 comme souche réceptrice. Enfin, l'étude de la relation clonale entre les souches multirésistantes a été déterminée par *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST).

Les résultats de cette étude ont montré une forte résistance des trois isolats de *E. coli* résistants aux carbapénèmes, et aux β -lactamines, avec une CMI de l'imipénème > 32 g / ml, et avaient aussi un niveau élevé de résistance aux aminoglycosides et les fluoroquinolones cependant, elles étaient sensibles uniquement à la fosfomycine et à la colistine. Selon les résultats des PCR, nous avons détecté qu'en plus de la présence du gène *bla*_{NDM-5} dans les trois isolats cliniques de *E.coli*, ces dernières co-exprimaient aussi le gène *bla*_{CTX-M-15} avec les gènes : *bla*_{TEM-1} et *aadA2*. De plus, les résultats des expériences de conjugaison, ont montré clairement que ces gènes de résistance ont été transférés par un plasmide qui confère la résistance à la plupart des β -lactamines, y compris l'imipénème et à tous les aminoglycosides. En outre, nous avons identifié par MLST un groupe de cinq souches appartenant au même clone ST2659, parmi les 33 souches multirésistantes étudiées, qui a été isolé dans le service de pédiatrie, entre Novembre 2012 et Janvier, suggérant qu'une épidémie nosocomiale avait eu lieu dans cette unité.

Enfin, nous pouvons conclure que l'épidémiologie des gènes codant pour les carbapénémases a changé dans le continent africain, et les variants du gène NDM ont efficacement diffusé dans le monde entier. Ces cas devraient soulever les préoccupations des populations sur l'incidence croissante de ces très multirésistantes souches hébergeant le gène NDM.

Mots-clés: *Escherichia coli*, New Delhi metallo bêta-lactamase, multirésistance.

Abstract

Escherichia coli is one of the most common causative agents of infection in humans, and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) has led to an increased use of carbapenem compounds. The growing incidence of resistance to carbapenems among *Enterobacteriaceae* is of major concern worldwide. Carbapenemase producers are mainly identified in *Klebsiella pneumoniae* and, to a lesser extent, in *E. coli* and other enterobacterial species. The aim of this study was to evaluate and characterize the genetic support of antibiotic resistance of strains of *E. coli* isolated in different hospital units of the University Hospital of the city of Annaba in 2012 and 2013. In this study, we have describe the first detection of *bla*_{NDM-5}-containing New Delhi metallo β -lactamase-producing *E. coli* clinical isolates in Algeria. A total of 105 consecutive and non duplicate *E. coli* clinical isolates were recovered from hospitalized and non hospitalized patients at the University Hospital of Annaba, « Dorban », Algeria, between January 2012 and February 2013. Our study showed that a total of 105 *E. coli* strains tested, 85 (80.95%) of them are ESBL +, 20 strains (19.04%) are producing ESBL and CHN, and of these, 3 strains (Ec 37, Ec 40, Ec 70) in this case are producing carbapenemases and hosting the *bla*_{NDM-5} gene. The first was isolated from blood of a child of 5 months, hospitalized in the pediatric ward, while the other two were found in urine samples from two patients aged 63 and 75 years. First, the identification of 105 strains of *E. coli* was performed by API 20E and confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Then the antibiotic susceptibility tests (disk diffusion method on agar and MIC by E. Test) were performed according to the recommendations of the French Society for Microbiology. Carbapenemase activity was determined using the modified Hodge test and the disk approximation tests using EDTA, and was also confirmed using the recently described new MALDITOFMScarbapenemase assay. Furthermore, the antibiotic resistance genes have been characterized by molecular biology techniques (PCR and sequencing). In addition, the transferability of resistance determinants was tested by conjugation experiments using *E.coli* J53 as the recipient strain. Finally, the study of clonal relationship between multiresistant strains was determined by Multi-Locus Sequence Typing (MLST). The results of this study showed a high resistance of the three carbapenem resistant *E.coli*, they were resistant to all β -lactams, with an

imipenem MIC of >32 g/ml and they had a high level of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones. They were susceptible only to fosfomycin, and colistin. PCR results revealed that the three *E.coli* isolates harbored the *bla*_{NDM-5} gene, in addition they coexpressed the *bla*_{CTX-M-15} gene with the *bla*_{TEM-1} and *aadA2* genes. Therefore conjugation experiments results, clearly revealed that these resistance genes were transferred via a plasmid that also confers resistance to most β -lactams, including imipenem and all aminoglycosides. In addition, we have identified by MLST a group of five strains belonging to clone ST2659 among the 33 multiresistant strains, which was isolated in pediatrics service, between November 2012 and January, suggesting that nosocomial outbreak had occurred in this unit. Finally, we can conclude that the epidemiology of carbapenemase encoding genes has changed in the African continent, and NDM gene variants efficiently disseminate worldwide. These cases should raise public concern once again over the increasing incidence of highly multidrug-resistant NDM-harboring strains.

Keywords: *Escherichia coli*, New Delhi metallo beta-lactamase, multidrug resistance.

ملخص

E. coli هي واحدة من مسببات الأمراض البشرية المعدية. انتشار مقاومة المضادات الحيوية من نوع الجيل الثالث لعائلة السيفالوسبورين بواسطة انتاج β -lactamases مع تمديد الطيف (ESBLs) إلى زيادة استخدام Carbapénèmes

تزايد حالات مقاومة carbapénèmes هو مصدر قلق كبير في جميع أنحاء العالم .
تعد *Klebsiella pneumoniae* و *E. coli* من أهم منتجي carbapénémases
كان الغرض من هذه الدراسة هو تقييم وتوصيف الأساس الجيني لمقاومة المضادات الحيوية لبكتيريا *E. coli* المعزولة من الخدمات المختلفة في المستشفى الجامعي لمدينة عنابة ما بين 2012 و 2013.
وفي هذه الدراسة، وصفت للمرة الأولى، وجود الجين blaNDM 5 في ثلاث عينات من بكتيريا *E. coli* المعزولة في الجزائر. تم عزل 105 سلالة غير متكررة من *E. coli* من المرضى الداخليين و المرضى الخارجيين عن المستشفى الجامعي للحكيم صبريان بعنابة ، الجزائر، بين يناير 2012 وفبراير 2013 و أظهرت هذه الدراسة ان من مجموعة 105 سلالة من *E. coli* المعزولة،
(80.95%) 85 هي BLSE+ ، منهم (2(19.04%) تنتج
ESBL و CHN التي منها ثلاث سلالات
(Ec 37, Ec 40, Ec 70) تنتج carbapénémases و تصنيف الجين blaNDM 5.
تم عزل الجين الأول من دم طفل دو 5 أشهر في جناح الأطفال ، في حين تم العثور على اثنين آخرين في عينات البول من اثنين من المرضى الذين تتراوح أعمارهم بين 63 سنة و 75 سنة. أولاً، تم تعريف العينات البكتيرية بواسطة استعمال

API 20E و (MALDI-TOF-MS) تم، أدلى اختبار الحساسية للمضادات الحيوية و CMI بواسطة
E. Test وفقاً لتوصيات الجمعية الفرنسية لعلم الأحياء الدقيقة.
تم تحديد نشاط carbapenemases

بواسطة اختبار هودج واختبار قرص التقريب باستخدام EDTA وقد تم التأكد
باستعمال الجهاز المكتشف حديثاً « MALDI TOF-MS carbapenemase »
وبالإضافة إلى ذلك، عينت الجينات المقاومة للمضادات الحيوية من خلال تقنيات البيولوجيا الجزيئية
(PCR و التسلسل الجيني). وعلاوة على ذلك، تم اختبار قابلية انتقال جينات المقاومة من خلال التجارب اقتران باستخدام *E. coli* J53
كسلالة مستقبلة. وأخيراً، تم تحديد دراسة العلاقة بين سلالات البكتيريا المقاومة بواسطة MLST
وأظهرت نتائج هذه الدراسة مقاومة عالية من العزلات الثلاث مقاومة كبيرة ل β -lactamines مع

CMi imipénème > 32 g / ml

وكانت أيضا العينات الثلاثة على مستوى عال من مقاومة أمينوجليكوزيدات وفلوروكينولونات إلا أنها كانت حساسة فقط
للفسفومييسين و كوليستين.

وفقاً لنتائج PCR وجدنا أنه بالإضافة إلى وجود جينات
blaNDM 5 في العينات الثلاثة ان هذه الأخيرة تحتوي على الجينات

*bla*TEM-1 و *aadA2* ، و *bla*CTX-M-15. وبالإضافة إلى ذلك أظهرت نتائج تجارب الاقتران بوضوح أن هذه الجينات المقاومة تم نقلهم من كبل البلازميد الذي يمنح مقاومة لمعظم بيتا اكتام، بما في ذلك إيميبينيم وجميع أمينوجليكوزيدات. وبالإضافة إلى ذلك، تمكنا بواسطة MLST

من تحديد مجموعة من خمس سلالات من نفس ST2659 تم عزلها في جناح الأطفال، بين نوفمبر 2012 ويناير، مما يدل على انتشار الوباء في هذه الوحدة. وأخيرا، يمكننا أن نستنتج أن وبائيات جينات *Carbapenemases* تهيئت في القارة الأفريقية ، كما أن كافة انواع جينات NDM قد نشرت بشكل فعال في جميع أنحاء العالم وينبغي لهذه الحالات ان تثير مخاوف الناس من تزايد انتشار هذا النوع من السلالات.

الكلمات المفتاحية: المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، NDM ، *E. coli*

ANNEXES

Annexe

Article publié

NDM-5 Carbapenemase-Encoding Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Algeria.

Asma Sassi, Lotfi Loucif, Sushim Kumar Gupta, Mazouz Dekhil, Houria Chettibi, Jean-Marc Rolain. Antimicrob Agents Chemother. September 2014, 58(9):5606-8.
doi:10.1128/AAC.02818-13

Published in Volume : 58 Issue 9 : September 2014

Online ahead of print : 30 June 2014

Nom du journal : Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Pays du journal : Etats-Unis

Latest Impact Factor* is **4.476**

NDM-5 Carbapenemase-Encoding Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Algeria

Asma Sassi,^{a,b,c} Lotfi Loucif,^{a,b} Sushim Kumar Gupta,^a Mazouz Dekhil,^c Houria Chettibi,^b Jean-Marc Rolain^a

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE), UMR CNRS, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France^a; Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria^b; Laboratoire Central de Microbiologie, CHU Annaba, Annaba, Algeria^c

Here, we report the first autochthonous cases of infections caused by *bla*_{NDM-5} New Delhi metallo-β-lactamase-producing *Escherichia coli* strains recovered from urine and blood specimens of three patients from Algeria between January 2012 and February 2013. The three isolates belong to sequence type 2659 and they coexpress *bla*_{CTX-M-15} with the *bla*_{TEM-1} and *bla*_{aadA2} genes.

Escherichia coli is one of the most common causative agents of infection in humans, and the emergence of resistance to third-generation cephalosporins by extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) has led to an increased use of carbapenem compounds (1). The growing incidence of resistance to carbapenems among *Enterobacteriaceae* is of major concern worldwide (1). Carbapenemase producers are mainly identified in *Klebsiella pneumoniae* and, to a lesser extent, in *E. coli* and other enterobacterial species. Carbapenemases are classified into three different classes (A, B, and D) and are now a serious problem due to their rapid spread in *Enterobacteriaceae* (1). Among the newly emerged β-lactamases in the world, New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) represents the latest threat for public health (2). It was first reported from *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates recovered from a Swedish patient previously hospitalized in India (2). Since then, seven additional NDM variants have been described worldwide (2) (Fig. 1). New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1), which can be produced by different *Enterobacteriaceae*, has been reported worldwide, including recently in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria (3). In this report, we describe the first detection of *bla*_{NDM-5}-containing New Delhi metallo-β-lactamase-producing *E. coli* clinical isolates in Algeria.

A total of 105 consecutive and nonduplicate *E. coli* clinical isolates were recovered from hospitalized and nonhospitalized patients at the University Hospital of Annaba, Algeria, and were screened for carbapenem resistance between January 2012 and February 2013. During the study period, out of the 105 isolates, a total of 3 isolates harbored the *bla*_{NDM-5} gene. Out of these 3 *bla*_{NDM-5}-positive isolates, one was isolated from the blood of a 5-month-old child hospitalized in the pediatric ward, while two were isolated from urine samples from a 63-year-old man and a 75-year-old man. The isolates were identified using the Bruker Daltonics Microflex matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Bremen, Germany), as previously described (3).

These three isolates were resistant to all β-lactams, with an imipenem MIC of >32 μg/ml and a high level of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones. They were susceptible only to tigecycline, fosfomycin, and colistin. Thus, NDM-5-harboring strains might be highly multidrug resistant, and a previous report on NDM-5-producing *E. coli* sequence type 648 (ST648) (GenBank accession no. JN104597) demonstrated that the strain was resistant to all available antimicrobials except tigecycline and

colistin (4), and we observed the same phenotype for our three isolates. Carbapenemase activity was determined using the modified Hodge test and the disk approximation tests using EDTA (4) and was also confirmed using the recently described new MALDI-TOF MS carbapenemase assay, as published previously (5). Therefore, this method has emerged as a powerful and cost-effective tool for the rapid detection of carbapenem resistance (5). In our study, the presence of the *bla*_{NDM-5} gene in the three isolates was confirmed by real-time PCR and further verified by standard PCR and sequencing (5). In addition, the three isolates coexpressed the *bla*_{CTX-M-15} gene with the *bla*_{TEM-1} and *bla*_{aadA2} genes. In order to study the transferability of the resistance phenotype, a conjugation experiment was performed between our clinical donor isolates and azide-resistant *E. coli* strain J53 as a recipient. The transconjugants were selected on MacConkey agar plates containing 2 μg/ml imipenem and 100 μg/ml sodium azide, as described previously (2). PCR amplification of the plasmid DNA and susceptibility profiling showed that all transconjugants became resistant to all tested antibiotics, except aztreonam and ciprofloxacin (Table 1), and they acquired the *bla*_{NDM-5}, *bla*_{TEM-1}, and *bla*_{aadA2} genes. The result clearly revealed that these resistance genes were transferred via a plasmid that also confers resistance to most β-lactams, including imipenem and all aminoglycosides. Multilocus sequence typing (MLST) was performed to characterize the genetic relationship of the *E. coli* strains; it was carried out on 30 *E. coli* strains, in addition to the three NDM-5-positive isolates, using seven housekeeping genes (*adh*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA*, and *mdh*), as described at the *E. coli* MLST Database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) (Fig. 2). The results revealed that the *E. coli* carbapenemase-positive strains belong to sequence type 2659, which was different from the NDM-5-producing ST648 *E. coli* strain (GenBank accession no. JN104597) isolated from the United Kingdom (6). This is the first reported ST2659 *E. coli* strain producing the NDM-5 carbapenemase-encoding gene.

ST2659 has been reported only once, from a domesticated cat

Received 31 December 2013 Accepted 22 June 2014

Published ahead of print 30 June 2014

Address correspondence to Jean-Marc Rolain, jean-marc.rolain@univ-amu.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02818-13

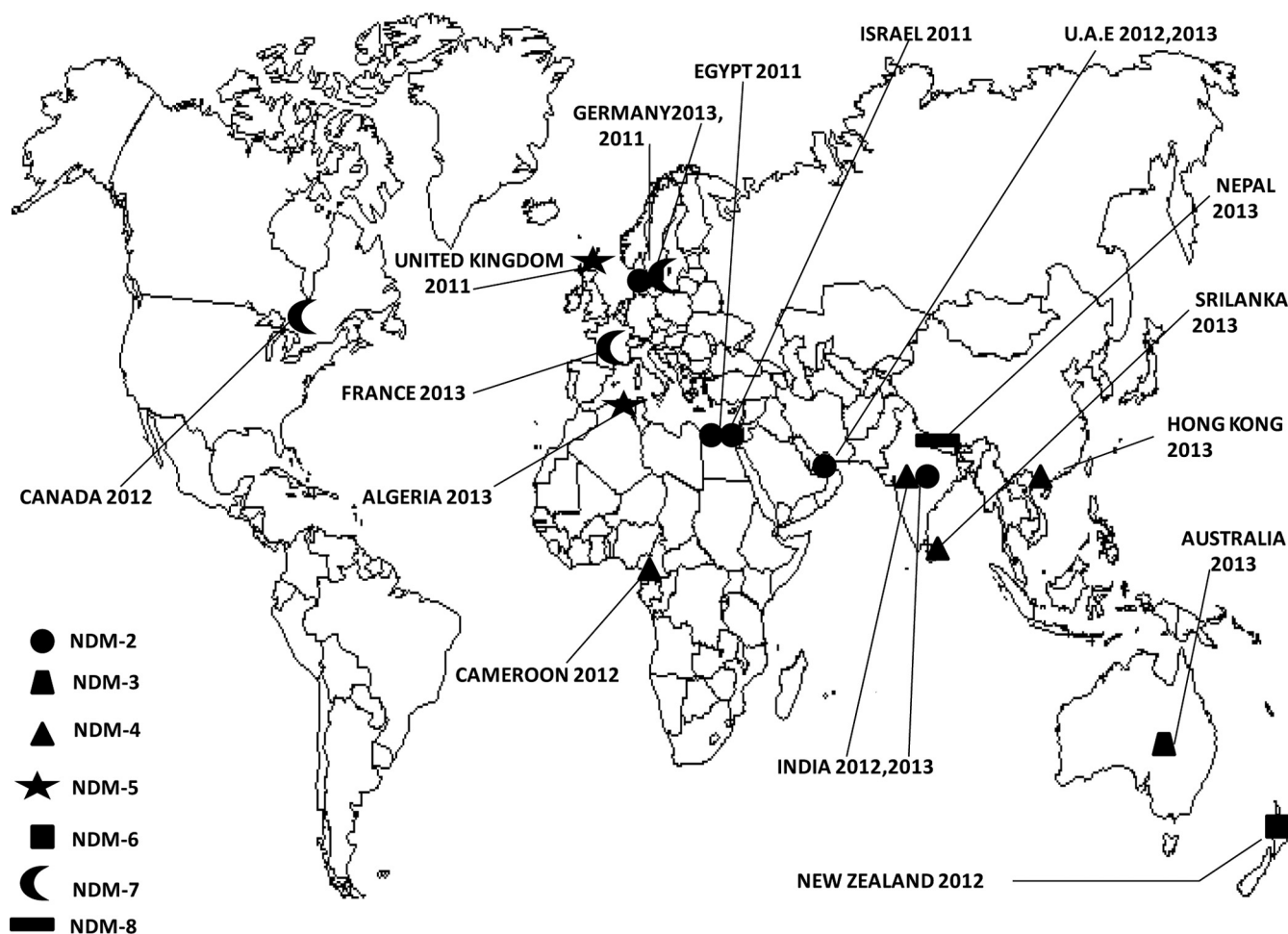


FIG 1 Geographic distribution of NDM variants detected worldwide.

in Germany (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). The reservoir of this gene in Algeria is unknown, but several contamination sources can be implicated. Various mobile genetic structures (insertion sequences, integrons, and transposons) can play an im-

TABLE 1 Antimicrobial susceptibility of the three clinical *E. coli* isolates producing the *bla*_{NDM-5} gene and their transconjugants

Antibiotic(s)	MIC (μg/ml) for:		
	<i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i> NDM-5	<i>E. coli</i> J53–NDM-5 transconjugants
Ampicillin	2	>256	>256
Amoxicillin-clavulanate	2	>256	>256
Piperacillin-tazobactam	1	>256	>256
Cefoxitin	4	>256	>256
Cefotaxime	2	>256	>256
Cefuroxime	4	>256	>256
Ceftazidime	0.064	>256	>256
Aztreonam	0.094	>256	0.094
Imipenem	0.25	>32	>32
Gentamicin	<1	>512	>512
Amikacin	<4	>512	>512
Tobramycin	<2	>512	>512
Ciprofloxacin	0.032	>32	0.032

portant role in the horizontal transfer of the *bla*_{NDM} gene between different species of bacteria, such as from *Acinetobacter* spp. to *E. coli* (6). Travelers contribute significantly to the global movement of microbes and resistance genes (6). Although nosocomial transmission of the *bla*_{NDM} gene has occurred in many countries (6), traveling to the Indian subcontinent is a significant risk factor for infection with an NDM-producing strain (6). The emergence of NDM-1-producing strains was linked to Asia and the Balkans (6). However, it has also been reported in autochthonous human cases worldwide (6). In contrast to other countries, where the *bla*_{NDM} gene has been identified mainly in *Enterobacteriaceae*, the *bla*_{NDM} gene has been reported only in *A. baumannii* clinical isolates from Algeria (3, 7). However, other types of carbapenemase-acquiring isolates have been reported in Algeria, such as *bla*_{VIM} in *Enterobacteriaceae* (8) and *P. aeruginosa* (9). The *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-23}, and *bla*_{OXA-58} genes have been also reported in Annaba and Tlemcen, Algeria (3, 10, 11). However, no reports are available on isolates of NDM-producing *E. coli* from Algeria and, to the best of our knowledge, we report here the first *bla*_{NDM-5} gene in *E. coli* from Algeria and on the African continent.

We can conclude that the epidemiology of carbapenemase-encoding genes has changed in the African continent, and NDM gene variants efficiently disseminate worldwide. These cases

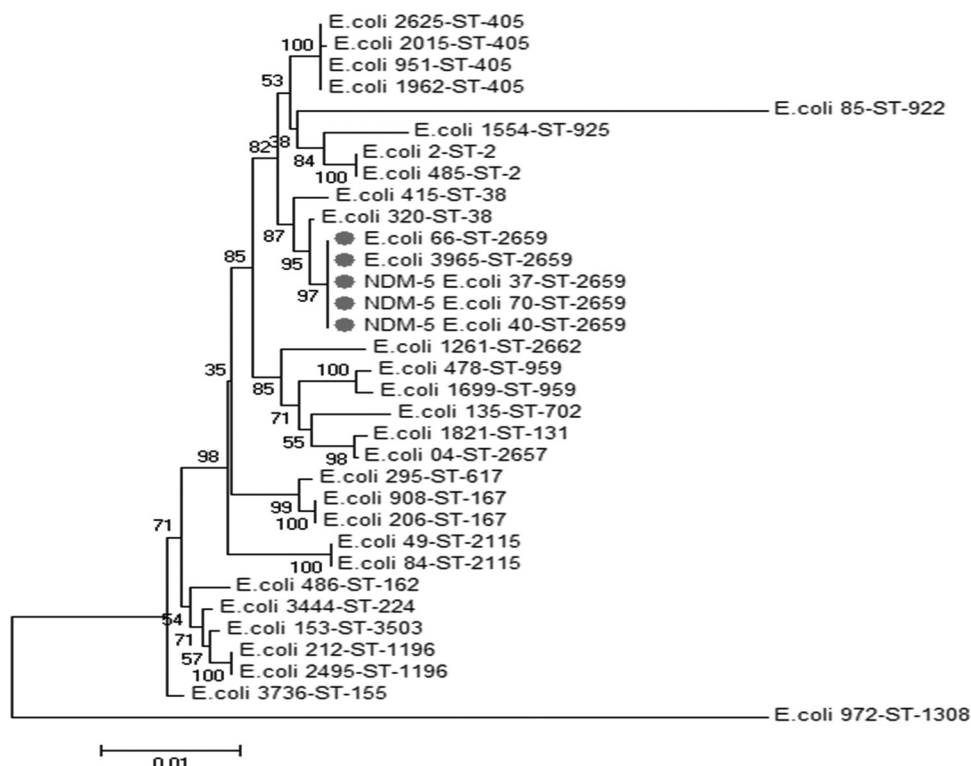


FIG 2 Concatenated phylogenetic tree showing the molecular relationships of the seven genes analyzed (*adk*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA*, and *mdh*) for 33 clinical *E. coli* isolates, including the three NDM-5-positive isolates. Gray circles indicate *E. coli* strains belonging to sequence type 2659. The number shown at each node indicates the bootstrap level from 500 replicates.

should raise public concern once again over the increasing incidence of highly multidrug-resistant NDM-harboring strains.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of the three *bla*_{NDM-5}-containing *E. coli* strains have been deposited in the GenBank database under accession no. [KF408072](#), [KF408073](#), and [KF408074](#).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Linda Hadjadj for technical assistance and Leanne McIlreavey for careful English corrections.

This work was partly funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and IHU Méditerranée Infection.

We declare no conflicts of interest.

All authors read and approved the manuscript.

REFERENCES

- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306–325. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5046–5054. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.
- Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* 17: 739–743. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.024>.
- Hornsey M, Phee L, Wareham DW. 2011. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5952–5954. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05108-11>.
- Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM. 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 7:e31676. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031676>.
- Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, He T, Ma L, Lai J, Shen Z, Liu Y, Shen J. 2012. Identification of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One* 7:e37152. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037152>.
- Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P. 2012. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05653-11>.
- Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. 2010. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:466–470. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00017-09>.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM. 2013. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:2426–2427. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00032-13>.
- Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain JM. 2012. Emergence of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40:89–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.017>.
- Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait Ameur A, Haouchine D, Sahli F, Rolain JM. 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J. Med. Microbiol.* 61:1341–1343. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.045807-0>.