



Master : Biotechnologie Microbienne

PROJET DE FIN D'ETUDES

« Les entérobactéries productrices des bétalactamases à spectre étendu en milieu communautaire clinique : étude dans la ville de Taza »

Stage effectué à : Institut Pasteur Maroc

Présenté par : Fouzia LAKBAKBI EL YAAGOUBI

Encadré par :

- **Etablissement d'accueil :** Dr.M.TIMINOUNI
- **FST- Fès :**Pr. A.HAGGOUD

Soutenu le : 20 juin 2012

Jury :

- Pr. K. ELBEKHTI
- Pr. A.HAGGOUD
- Dr.M. EL AZHARI
- Dr.M.TIMINOUNI
- Pr. S.ANANOU

Année universitaire : 2011-2012



Remerciement

Au terme de ce mémoire,

J'exprime mes sincères remerciements a Monsieur le Doyen de la faculté des Sciences et Techniques de Fès Mohcine ZOUAK. Veuillez accepter ici, le témoignage de mon respect et de ma grande estime.

Ma profonde reconnaissance est adressée a Monsieur le professeur Abdelatif HAGGoud, responsable du Master « biotechnologie microbienne », pour m`avoir permis de suivre cette formation et pour avoir accepté de juger ce travail qui l` a clôturé en acceptant de présider ce jury. Mes vifs remerciements pour l`intérêt qu`il a porté à mon travail.

Je désire témoigner toute ma gratitude a Monsieur le docteur Mohammed TIMINOUNI, responsable du laboratoire de la bactériologie moléculaire, mon encadrant pour m`avoir intégrer rapidement au sein de l`Institut Pasteur Maroc ; pour m`avoir confié ce sujet et avoir dirigé judicieusement ce travail. J`aimerais exprimer ma reconnaissance pour son aide et ses précieux conseils, ainsi que pour sa disponibilité et sa compréhension

Ma profonde reconnaissance est adressée aux membres du jury ; Mme le professeur K.BEKHTI et Mr le professeur S. ANANOU.d`avoir accepté juger ce travail, veuillez accepter l`expression de ma respectueuse considération. Mes chaleureux remerciements s`adressent a Mr .A.BARGUIGA pour son aide et sa disponibilité.

Tous mes vifs remerciements aux membres du laboratoire pour leur accueil et leurs coopérations professionnelles tout au long de mon stage à citer ; Mlle L.



JAMALI, Mlle Z. GHZLAN, Mme K.NAYME Ainsi que mes collègues de stage
; Youssef GHANMI et Abdelatif.

Dédicaces

Je dédie ce présent travail:

A mes chers parents

Qui tiennent une place immense dans mon cœur.

Aucune dédicace ne serait exprimer la reconnaissance, le respect et l`estime que
je vous porte.

Puisse ce travail, fruit de vos efforts, vos sacrifices, puisse dieu vous donner
bonne santé et longue vie.

A mes frères et sœurs

Loubna, Safae, Youness et Zaid, Ce travail sera le témoignage de mon amour et
de mon affection fraternelle profonde pour votre soutien et vos encouragements
J`espère que vous trouvez dans ces quelques mots l`expression de mes vœux de
bonheur et de réussite

A mon cousin Mohammed

Pour ton soutien moral, et ton aide lors de la rédaction de mon rapport, je te
souhaite un excellent avenir

A mes chers amis

Merci pour votre soutien

A tous ceux qui ont participe a ma formation

Que dieu vous bénisse....



RESUME

L'évolution de la résistance aux antibiotiques constitue un élément essentiel du problème de l'utilisation intensive en médecine humaine et vétérinaire de ces molécules. Parmi ces antibiotiques, ceux de la famille des β -lactamines,. Pour les entérobactéries, le mécanisme principal de cette résistance est lié à la production d'enzymes de type β -lactamases à spectre élargi BLSE.

Les objectifs de cette étude sont multiples :

dans un premier temps il s'agit d'étudier la répartition des entérobactéries responsables des infections communautaires, collectées à partir du laboratoire d'analyse médicale dans la ville de TAZA ensuite d'étudier leurs sensibilités aux antibiotiques de différentes familles.

Dans un deuxième temps, nous allons étudier la prévalence des entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et nous allons caractériser leurs types de BLSE ensuite nous rechercherons la coexistence avec d'autre gène de résistance (*qnr*,*qepA*,*aac(6)*-*Ib-cr*, *integron-1*)

Dans un troisième temps nous nous pencherons sur l'étude de la mobilité du support génétique des gènes de résistance par conjugaison, ainsi que la relation épidémiologique entre les entérobactéries productrices de BLSE.

notre étude étalée sur quatre mois, 84 entérobactéries collectées sont responsables des infections communautaires, en particulier les infections urinaires(IU) dont 87,5% sont des *E. coli* suivis à 64% de *Klebsiella pneumoniae*, à 21,43%, de *Proteus spp* , à 8,33%, de *Citrobacter spp*, à 3,57% et à puis *Providencia spp* avec 2,38%. Le pourcentage de résistance de ces entérobactéries à l'érythromycine est le plus important (84,52%). Onze souches d'entérobactéries ont été productrices de BLSE (11,9%), présentent une résistance à



au moins 4 familles d'antibiotiques. Les BLSE exprimées sont de type CTX-M (9/10), OXA-1 (7/10), TEM (4/10) et SHV (3/10). Huit souches exprimaient au moins deux types de bêta-lactamase. Une souche a été trouvée productrice de céphalosporine plasmidique de type CIT. Les gènes de résistance plasmidique aux quinolones ont été trouvés chez les entérobactéries productrices de BLSE sont les gènes qnrB (n=3) et aac(6')-Ib-cr (n=7). L'intégron classe I a été détecté chez 6 souches BLSE. Les transferts génétiques ont montré que blaCTX-M gène est porté par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (125Kb). Le typage moléculaire des 11 souches par ERIC/REP-PCR a révélé 7 profils différents.

Les infections à entérobactéries productrices de BLSE sont difficiles à traiter et peuvent être la source d'impasses thérapeutiques. Il devient impératif de mettre en œuvre une surveillance systématique de ces entérobactéries et surveiller la circulation de ces gènes de résistance dans les infections communautaires

Mots clés : infections communautaires, profil d'anti-biorésistance, BLSE, AmpC, résistance plasmidique aux quinolone, integron classe 1.



Abstract

The antibiotic resistance has become a major public health problem. This evolution of antibiotic resistance is due largely to the increasing use of antibiotics in human and veterinary medicine. β -Lactams are the most prescribed antibacterials for the treatment of bacterial infections. Enterobacteriaceae have developed mechanisms to resist the action of β -lactam drugs, of which the catalytic function of extended spectrum β -lactamase (ESBL) is the most important.

The objectives of this study are to: (1) studied of the composition and antibiotics resistance of community enterobacteria isolates were collected from the microbiology laboratories of Taza city; (2) the prevalence of ESBL producing enterobacteriaceae and screening of β -lactamases (ESBL and AmpC) genes, plasmid mediated quinolone resistance genes (*qnr*, *aac(6')*-Ib-cr, *qepA*) and integrons class I by PCR; (3) and we studied plasmid mediated transfer of resistance to beta-lactam antibiotics and epidemiological relationships between ESBL-producing Enterobacteriaceae .

During the 4-month study, 84 isolates of Enterobacteriaceae were collected from community infections. *E. coli* (87.5%) was the most frequent isolate detected followed by *K. pneumoniae* (21.43%), *Proteus spp.* (8.33%), *Citrobacter spp.* (3.57%) and *Providencia spp.* (2.38%). High resistance level was recorded to erythromycin (84.52%) in these enterobacteriaceae collected. Ten isolates (11.9%) were defined as ESBLs producers. The ESBLs producer isolates were resistant to 4 or more antibiotics family. *bla*CTX-M group1 was the most prevalent (9/10) followed by *bla*OXA-1 (7/10), *bla*TEM (4/10) and *bla*SHV (3/10). Eighte strains expressed at least two *bla* genes. One isolate (1.19%) was AmpC β -lactamase phenotype producer and the plasmid mediated AmpC β -lactamase type detected was CIT type. The plasmid mediated quinolone resistance genes were detected in eight isolates, with *qnrB* (n=3) and *aac(6')*-Ib-cr (n=7) genes were detected. The class1 integrons were detected in 6 of these isolates, with amplicons 1.6 kb in length were the most frequent detected. We have shown that *bla*CTX-M was transferred by a conjugative plasmid of high molecular weight (125Kb). ERIC and Rep-PCR analysis differentiated the 11 isolates into 7 unique profiles.



Management and treatment of ESBL-producing Enterobacteriaceae infections can be challenging. It is therefore essential to include the molecular technique as part of the surveillance to monitor the circulation of these resistant genes in a community setting.

Avant propos

La présente étude a été effectuée au cours d'un stage au laboratoire de Bactériologie Moléculaire, département de la recherche scientifique, Institut Pasteur du Maroc (IPM), en vue de réaliser un mémoire de Master, dans le cadre d'une collaboration avec la Faculté des Sciences et techniques de Fès.

L'IPM de Casablanca est un établissement public a été créé en 1929, doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière, placé sous la tutelle administrative du ministre chargé de la santé publique et dont le siège est à Casablanca. L'IPM est membre du Réseau International des Instituts Pasteur et aussi membre de l'Association Internationale des Instituts Nationaux de Santé Publique. L'IPM de Casablanca assure trois missions principales : la recherche, l'amélioration de la santé publique et l'enseignement. L'IPM est chargé de poursuivre des recherches sur les maladies infectieuses et parasitaires de l'homme, des animaux et des plantes. Il peut être chargé, par le ministre chargé de la santé publique, de missions permanentes ou occasionnelles, d'enquêtes, d'expertises ou d'analyses se rapportant à ces disciplines ; de contribuer, le cas échéant, à l'enseignement de la microbiologie et de la parasitologie ainsi que de recevoir des stagiaires et des travailleurs marocains ou étrangers et de préparer ou d'importer des sérums, vaccins, ferments et produits biologiques nécessaires aux besoins du pays en ce qui concerne la médecine humaine.

Le Laboratoire de Bactériologie moléculaire à l'IPM de Casablanca a pour missions de participer à l'enseignement de la microbiologie en sciences biomédicales et en médecine vétérinaire et aussi l'encadrement des étudiants des différentes universités du royaume dans le cadre de la préparation de différents diplômes universitaires (Master, Doctorat, Projet de fin d'étude, diplôme d'Ingénieur). A côté de l'enseignement, le laboratoire développe une importante activité de recherche. Les activités du laboratoire portent sur un problème majeur de Santé Publique dans les pays en voie de développement, à savoir la résistance aux antibiotiques



chez les bactéries à gram négatif (notamment les bêta-lactamines et les quinolones chez les entérobactéries et les bactéries à Gram positif et aussi la relation entre la résistance aux antibiotiques et le phénomène d'adhésion bactérienne et formation de Biofilm. Les travaux de recherche fondamentale réalisés dans le laboratoire de bactériologie

moléculaire sont **axés essentiellement sur l'identification des mécanismes de résistance aux antibiotiques, étude du support génétique, et l'analyse des clones circulants.**

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Classification générale des entérobactéries..... | 5 |
| Tableau2 : Mécanismes d'actions des antibiotiques..... | 8 |
| Tableau3 : Les amorces utilisées pour amplifier les séquences d'intérêt..... | 33 |
| Tableau4 : Les conditions d'amplification des gènes codant pour des bêta-lactamases..... | 34 |
| Tableau5 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes plasmidiques de type AmpC..... | 35 |
| Tableau 6 : Les conditions d'amplification des gènes codant pour AmpC..... | 35 |
| Tableau7 : Les amorces des gènes qnrA, qnrB et qnrS utilisées..... | 36 |
| Tableau8 : Programmes d'amplifications des gènes de résistance plasmidiques aux quinolones..... | 37 |
| Tableau9 : Les amorces d'ERIC-PCR et REP-PCR utilisées..... | 41 |
| Tableau10 : Répartition des espèces en fonction du sexe et de l'âge des patients..... | 44 |
| Tableau11 : Résultats des données des différentes souches productrices de BLSE..... | 47 |
| Tableau12 : Résumé les résultats de PCR obtenus pour les 11 souches étudiés..... | 49 |
| Tableau13 : Résumé les résultats de PCR des gènes de résistance coexistant avec les blse..... | 52 |
| Tableau 14 : Résultats de la détection de l'intégron 1..... | 53 |
| Tableau15 : Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : BLSE, PMQR et leurs transconjugants | 54 |
| Tableau16 : Relation épidémiologique entre les 11 souches étudiées par ERIC/REP-PCR..... | 56 |

LISTE DES FIGURES



| | |
|---|----|
| Figure1 : Structure de la paroi bactérienne..... | 9 |
| Figure2 : Structure chimique de l'anneau bêta-lactame..... | 10 |
| Figure 3 : Structure chimique de la pénicilline, de l'ampicilline et de l'amoxicilline..... | 10 |
| Figure4 : Acide 7-aminocéphalosporanique, noyau de base des céphalosporines..... | 11 |
| Figure5 : Mode d'action d'une bêta-lactamases de type sérine enzyme..... | 23 |
| Figure6 : La séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction FokI..... | 37 |
| Figure7 : la nature des infections communautaire chez les deux sexes..... | 43 |
| Figure8 : Répartition des patients en fonction de l'âge et du sexe..... | 43 |
| Figure9 : Répartition des souches en fonction de l'espèce..... | 44 |
| Figure10 : Fréquences de la résistance des entérobactéries étudiés vis-à vis..... | 45 |
| des différents antibiotiques | |
| Figure11 : Exemple d'une souche productrice de BLSE détectée par le test de synergie (A) et double diffusion (B) | 46 |
| Figure 12 : Profil de la PCR du gène CTX-M1..... | 48 |
| Figure 13 : SHV PCR (795bp)..... | 48 |
| Figure 14 : Profil de la PCR du gène TEM..... | 48 |
| Figure 15 : Profil de la PCR du gène OXA..... | 48 |
| Figure 16 : Profil de la PCR du gène AmpC..... | 49 |
| Figure 17 : détection du gène qnr (A, B et S) par PCR multiplex..... | 50 |
| Figure18 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification..... | 51 |
| par PCR pour le gène aac(6')-Ib | |
| Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de digestion Enzymatique (RFLP) pour la détection des variants aac(6')-Ib-cr et aac(6')-Ib | 51 |
| Figure20 : profil électrophorétique de l'intégron classe 1..... | 52 |
| Figure 21 : Détection des TC BLSE (TC 62 et TC54)..... | 54 |
| Figure22 : Profil plasmidique de la souche d'origine (54) et leur transconjugants..... | 54 |
| (Tc.54-1 et Tc54-2). | |
| Figure23 : Profil plasmidique de la souche d'origine (62) et leur transconjugants..... | 55 |
| (Tc.62-1 et Tc 62-2). | |
| Figure 24 : Résultats d'ERIC –PCR des 11 souches BLSE..... | 56 |
| Figure25 : Résultats de REP-PCR..... | 56 |



LISTE DES ABREVIATIONS

- AK** : Amikacine
ATM : Aztreonam
CAZ : Ceftazidime
CFM : Cefixime
CIP : Ciprofloxacine
GM : Gentamycine
CRO : Ceftriaxone
CS : Colistine
ETP : Ertapeneme
IPM : Imipenème
K : Kanamycine
NA : Acide Nalidixique
SAM: Ampicilline/sulbactam
SXT : Cotrimoxazol = Triméthoprimine + Sulfaméthoxazol
TCC: Ticarcilline + Ac. Clavulanique
TE : Tétracycline
TOB: Tobramycine
TMP: Triméthoprimine
CTX : Cefotaxime
AZI : Azide de sodium
BLSE: Bêta-lactamase à Spectre Élargi
C1G : Céphalosporines de première Génération
C2G : Céphalosporines de deuxième Génération
C3G : Céphalosporines de troisième Génération
CA-SFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie



EBLSE : Entérobactéries productrices de Bêta-lactamases à spectre élargi

IU : Infection urinaire

LB : Luria-Bertani

M.H : Muller-Hinton

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

PMQR : Plasmid mediated quinolone resistance

qepA : Quinolone efflux pumps

Qnr : Quinolones resistance

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

S : Sensible

R : Resistant

L : limite

T- :Témojn négatif

T+ : Témojn positif

TBE : Tris-Borat-EDTA

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

REP-PCR : Repetitive extragenic palindromic-PCR

Sommaire

| | |
|---|---|
| Introduction | 1 |
| I. Les Entérobactéries | 5 |
| I.1. Définition et classification | 5 |
| I.2. Habitat et pouvoir pathogène | 6 |



| | | |
|---------------|---|----|
| I.3. | Caractères culturaux | 7 |
| I.4. | Caractères antigéniques | 7 |
| II. | Les antibiotiques..... | 8 |
| II.1. | Définition | 8 |
| II.2. | Les β -lactamines..... | 9 |
| II.2.1. | Définition..... | 9 |
| II.2.2. | Mécanisme d'action des β -lactamines : | 10 |
| II.2.3. | Classification des β -lactamines | 10 |
| II.2.3.a. | Penams | 11 |
| II.2.3.b. | Céphèmes ou Céphalosporines..... | 11 |
| II.2.3.c. | Pénèmes | 13 |
| II.3. | Quinolones | 13 |
| II.3.1. | Définition..... | 13 |
| II.3.2. | Les mécanismes de résistance aux quinolones | 13 |
| II.3.2.a. | Les résistances intrinsèques | 14 |
| II.3.2.b. | Les résistances acquises | 14 |
| II.3.2.b.1. | Les résistances à médiation chromosomique..... | 15 |
| II.3.2.b.1.1. | Modifications de la cible | 15 |
| II.3.2.b.1.2. | Diminution de l'absorption cellulaire | 16 |
| II.3.2.b.1.3. | Augmentation de l'expulsion | 16 |
| II.3.2.b.2. | La résistance plasmidiques aux quinolones | 17 |
| II.3.2.b.2.1. | Le gène <i>qnr</i> : protection de la cible | 17 |
| III. | Mécanisme de résistance des entérobactéries aux antibiotiques | 21 |
| III.1. | Définition de la résistance | 21 |
| III.2. | Mécanismes de résistance aux antibiotiques : | 22 |
| III.2.1. | Mécanismes de résistance chromosomique | 22 |
| III.2.2. | Mécanismes de résistance extra-chromosomique..... | 22 |
| III.3. | Résistance aux beta-lactamines | 23 |
| III.3.1. | Mécanismes de résistance aux β -lactamines..... | 23 |
| III.3.1.a. | Modification d'affinité de la cible | 23 |
| III.3.1.b. | Mécanisme d'imperméabilité..... | 23 |
| III.3.1.c. | Mécanisme d'efflux | 23 |
| III.3.1.d. | Mécanisme enzymatique | 24 |
| IV. | Les β -lactamases | 24 |
| IV.1. | Généralité | 24 |
| IV.2. | Les β -Lactamases à Spectre Etendu (BLSE)..... | 25 |
| IV.2.1. | Définition..... | 25 |



| | | |
|-------------------------------|---|----|
| IV.2.2. | Classification des BLSE | 25 |
| IV.2.2.a. | Classification d' Ambler | 25 |
| IV.2.2.b. | La classification de Bush-Jacobi-Medeiros..... | 25 |
| IV.2.3. | Les types de BLSE produites par <i>Enterobacteriaceae</i> | 26 |
| IV.2.3.a. | BLSE de type TEM..... | 26 |
| IV.2.3.b. | BLSE de type SHV | 26 |
| IV.2.3.c. | BLSE de type CTX-M | 26 |
| IV.2.3.d. | BLSE de type OXA..... | 27 |
| IV.2.3.e. | Autres types de BLSE | 27 |
| IV.2.3.e.1. | BLSE type PER | 27 |
| IV.2.3.e.2. | BLSE type VEB..... | 27 |
| IV.2.3.e.3. | BLSE type GES | 27 |
| IV.2.3.e.4. | BLSE type SFO | 27 |
| IV.2.3.e.5. | BLSE type TLA..... | 27 |
| V. | Autres enzymes de résistance aux bêta-lactamines | 28 |
| V.1. | Céphalosporinases..... | 28 |
| V.2. | Les Carbapénèmases | 28 |
| VI. | Mécanismes de dissémination des entérobactéries productrices de BLSE | 28 |
| VII. | Facteurs de risque :..... | 28 |
| | Objectifs d'étude..... | 30 |
| - Matériel et méthodes | | |
| I. | Souches étudiées:..... | 32 |
| II. | Etude de la sensibilité aux antibiotiques..... | 32 |
| II.1. | Détection des souches BLSE..... | 33 |
| II.1.1. | Le test de synergie..... | 33 |
| II.1.2. | Test de confirmation : double diffusion..... | 33 |
| III. | Etude génotypique..... | 33 |
| III.1. | Extraction de l'ADN total | 33 |
| III.2. | Typage moléculaire des gènes BLSE produites | 34 |
| III.3. | Dépistage des gènes codant pour de céphalosporinase plasmidique de type Amp C | 35 |
| III.4. | Dépistage des gènes de résistance plasmidique aux quinolones..... | 36 |
| III.4.1. | Dépistage des gènes <i>qnr</i> par la PCR Multiplex | 36 |
| III.4.2. | Dépistage de gène <i>qepA</i> par la PCR simplex..... | 37 |
| III.4.3. | Dépistage du gène <i>aac (6')-Ib</i> | 37 |
| III.4.4. | Identification de <i>aac (6')-Ib</i> : | 38 |
| III.5. | Détermination des intégrons classe 1 | 39 |
| III.6. | Electrophorèse sur gel d'agarose..... | 39 |



| | | |
|-------------|--|----|
| III.7. | Etude de transfert des gènes de résistance / conjugaison. | 40 |
| III.8. | Extractions des plasmides | 41 |
| III.9. | Typage moléculaire des <i>Entérobactéries</i> productrices de BLSE : ERIC/REP-PCR..... | 42 |
| - Résultats | | |
| I. | Etude clinique | 43 |
| I.1. | La nature des infections communautaire causées par les entérobactéries étudiées | 43 |
| I.2. | Répartition des patients en fonction de l'âge et du sexe : | 44 |
| I.3. | Répartition des souches bactériennes en fonction des espèces..... | 45 |
| I.4. | Répartition des espèces en fonction du sexe et de l'âge des patients | 45 |
| II. | Profil de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques | 46 |
| III. | Prévalence des entérobactéries productrices de BLSE et céphalosporinase plasmidique de type AmpC | 47 |
| IV. | Etude génotypique | 48 |
| IV.1. | Typage moléculaire des BLSE produites | 48 |
| IV.2. | Typage moléculaire des AmpC produites | 49 |
| IV.2.1. | Résultats de PCR des gènes de résistance plasmidique aux quinolones | 50 |
| IV.2.1.a. | Recherche des gènes <i>qnr</i> | 51 |
| IV.2.1.b. | Recherche du gène <i>qep A</i> | 51 |
| IV.2.1.c. | Résultats de PCR du gène <i>aac(6')-Ib</i> | 51 |
| IV.2.2. | L'intégron de classe 1 (<i>intI</i>)..... | 53 |
| IV.2.3. | Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison | 54 |
| V. | Détermination de la relation épidémiologique: | 57 |
| | Conclusion | 65 |
| | Perspectives..... | 66 |
| | Références..... | 68 |
| | Webographie..... | 78 |
| | Annexes..... | 79 |



Introduction

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Depuis leur première utilisation en 1942, les β -lactamines représentent la famille d'antibiotiques la plus largement développée et la plus diversifiée dans le monde. Cette utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et le faible coût de certaines molécules

Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, soit dans la communauté ou à l'hôpital, modifie considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux de bactéries résistantes. Par conséquent ces bactéries résistantes deviennent une source majeure de mortalité, et de l'augmentation du coût de soins de santé [1].

Au Maroc comme partout dans le monde, la surveillance et la maîtrise de la diffusion des bactéries multi-résistantes est une priorité dans la lutte contre les infections communautaires et nosocomiales, parmi lesquelles les entérobactéries productrices de bêta-lactamases constituent un groupe très important [2]. Ces dernières ont été décrites pour la première fois en 1983 chez *Klebsiela pneumoniae* et ont causé depuis de nombreuses épidémies [3]. Les BLSE confèrent aux entérobactéries des résistances aux monobactames et oxyiminocéphalosporines, mais pas aux céphamycines et carbapénèmes [4]. Les études génétiques ont montré que les BLSE dérivent par mutation(s) ponctuelle(s) d'anciennes bêta-lactamases de type TEM-1, TEM-2 et SHV-1, plus récemment, on note l'émergence de nouvelles BLSE non dérivées des pénicillinases: les céfotaximases de type CTX-M et les ceftazidimases de type PER, GES et VEB [4].

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux Entérobactéries productrices des BLSE isolées dans la communauté Marocaine. En effet, il a été constaté ces dernières années au Maroc, une recrudescence des entérobactéries multi-résistantes dans le milieu communautaire [5]. Notre but est donc de caractériser phénotypiquement et génotypiquement les *Entérobactéries* productrices de BLSE isolées à partir des infections communautaires de la ville de Taza, afin de :



- ✓ Étudier la répartition des entérobactéries responsables d'infections communautaires dans la ville de TAZA ;
- ✓ Évaluer la sensibilité de ces souches aux antibiotiques ;
- ✓ Déterminer la prévalence des entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ;
- ✓ Typer les gènes codant pour les BLSE responsables de cette résistance et étudier la mobilité de leurs supports génétiques.
- ✓ Étudier la coexistence des autres gènes de résistance aux antibiotiques
- ✓ Étudier la relation épidémiologique entre les souches productrices des BLSE étudiées.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biolog



Etude bibliographique



I. Les Entérobactéries

Les entérobactéries semblent plus spécifiquement adaptées à l'homme ou l'animal ; certaines sont responsables d'infections humains parfois sévères (fièvre, typhoïde, dysenterie bacillaire, peste). C'est une très vaste famille qui représente près des 2/3 des isolements d'un laboratoire de bactériologie médicale [7].

I.1. Définition et classification

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs [7]:

- Ce sont des bacilles Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 μm de long sur 0,3 à 1 μm de large ;
- Mobiles par ciliature péritriche ou immobiles ;
- Se développent en aéro-anaérobiose et sur milieux nutritifs ;
- Acidifient le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- Ne possèdent pas d'oxydase ;
- Réduisent les nitrates en nitrites.

Une centaine d'espèces d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en clinique [7]. Les entérobactéries qui intéressent la biologie médicale peuvent être regroupées en 4 tribus : *Escherichiae*, *Klebsiellae*, *Proteae* et *Yersiniae* (tableau 1). Ces différentes tribus peuvent être subdivisées en genres ou en sous-genres, en espèces, en serogroupes, en serotypes (1, 7).

Les *Enterobacteriaceae* ont un G + C % du DNA compris entre 38 et 60 mol %. Les travaux de taxonomie génétique basés sur l'hybridation de DNA ont entraîné la distinction récente de nouveaux genres et de nouvelles espèces dont beaucoup n'ont pas de pouvoir pathogène défini.

La principale classification des entérobactéries a été faite par Ewing

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION GENERALE DES ENTEROBACTERIES(8)

| Types | Genres |
|-----------------------|---------------------|
| <i>Escherichieae</i> | <i>Escherichia</i> |
| | <i>Shigella</i> |
| <i>Edwardsielleae</i> | <i>Edwardsiella</i> |
| <i>Salmonelleae</i> | <i>Salmonella</i> |
| <i>Citrobactereae</i> | <i>Citrobacter</i> |
| <i>Klebsielleae</i> | <i>Klebsiella</i> |
| | <i>Enterobacter</i> |
| | <i>Hafnia</i> |
| | <i>Serratia</i> |
| <i>Proteus</i> | <i>Proteus</i> |
| | <i>Morganella</i> |
| | <i>Providencia</i> |
| <i>Yersinieae</i> | <i>Yersinia</i> |
| <i>Erwinieae</i> | <i>Erwinia</i> |
| Divers | <i>Buttiauxella</i> |
| | <i>Cedecea</i> |
| | <i>Ewingella</i> |
| | <i>Kluyvera</i> |
| | <i>Tatumella</i> |
| | <i>Rahnella</i> |

I.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont pour la plupart des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ces bactéries représentent la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobie. Chez l'homme, l'entérobactérie prédominante est *Escherichia coli*. Parmi les nombreuses espèces d'entérobactéries, certaines sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux. Il en est qui ont un pouvoir phyto-pathogène.

Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines (*Shigella*) sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections chez les malades fragilisés (*Klebsiella*). Leur identification constitue une part importante du travail du laboratoire de bactériologie (7,1).

I.3. Caractères culturaux

Les *Enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37C [1].

➤ Les formes S (smooth)

Les colonies sont lisses, bombées brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène [1].

➤ Les formes R (rough)

Elles s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, a contours irréguliers et teinte mate ; En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux [1].

➤ Les colonies muqueuses

Elles sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence [1].

➤ Les colonies naines

Elles s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques [1].

I.4. Caractères antigéniques

L'identification des *Enterobacteriaceae* se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination du serotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques [7].

➤ Les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou l'acide [7].

➤ Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermostables et inactivés par l'alcool [7].

➤ Les antigènes K



Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L,A,B, de *E.coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. ils sont détruits par ébullition de 2 heures

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88,K99) [7].

➤ **Antigène Kunitin**

Cet antigène commun des Enterobacteriaceae n'est pratiquement retrouvé que dans cette familles et a intérêt taxonomique [7].

II. Les antibiotiques

II.1. Définition

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, hémi-synthétiques ou synthétiques. Leur caractéristique majeure est leur grande spécificité d'action sur certains sites cellulaires, à la différence des antiseptiques et des désinfectants, leur permettant d'agir à de très faibles concentrations non toxiques pour l'hôte [13]. En fonction de leur type d'activité, les antibiotiques peuvent être bactériostatiques ou bactéricides [13].

Il existe différents types d'antibiotiques. Certains ne sont efficaces que contre un certain nombre de bactéries. On les appelle les antibiotiques à spectre étroit. Dans la mesure du possible le médecin prescrira ce type d'antibiotique parce qu'ils ne seront actifs que sur les bactéries responsables de l'infection et non contre d'autres bactéries utiles ou inoffensifs.

D'autres antibiotiques ont une action plus large et sont actifs sur plusieurs bactéries. Ce sont les antibiotiques à large spectre. On les utilise si on ne connaît pas précisément le germe pathogène ou s'il y a plusieurs pathogènes en jeu [15].

Il existe plusieurs classes d'antibiotiques selon leur spectre d'action, leur structure chimique ou leurs mécanismes d'actions (tableau 2) [16].

TABLEAU2 : MECANISMES D' ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES [16]



| Familles d'antibiotiques | Mécanismes d'action |
|---|---|
| Béta-lactamines | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane |
| Aminoglycosides | Inhibition de la synthèse protéique (inhibition de l'initiation et de la traduction) |
| Macrolides, Lincosamides et Streptogramines | Inhibition de la synthèse protéique (inhibition de la translocation de l'ARN _m) |
| Sulfamides et Diaminopyrimidines | Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (par inhibition de la synthèse des acides foliques) |
| Tétracyclines | Inhibition de la synthèse protéique (empêche la liaison ARN _m /ARN _r) |
| Phénicolés | Inhibition de la synthèse protéique (inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique) |
| Peptides | Inhibition de la synthèse du peptidoglycane |
| Quinolones | Inhibition de la réplication et de la transcription (inhibition d'ADN-Gyrase et de la topoisomérase IV) |

II.2. Les β -lactamines

II.2.1. Définition

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β -lactamases (IBL), est caractérisée par la présence constante de l'anneau β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations, depuis plus de 60 ans [9].

II.2.2. Mécanisme d'action des β -lactamines :

Le mécanisme commun d'action anti-bactérienne des antibiotiques de cette famille est fourni par leur capacité à inhiber la synthèse de la paroi bactérienne. La synthèse et l'attachement du

peptidoglycane à la paroi cellulaire bactérienne requièrent de multiples enzymes. Parmi ces enzymes, les (PLP) protéines cibles liants la pénicilline, localisées au niveau de la membrane cytoplasmique, sont impliquées dans la phase terminale de l'assemblage du peptidoglycane et assurent l'activité essentielle de carboxypeptidase, d'endopeptidase ou de transpeptidase. Les antibiotiques de la famille des bêta-lactames se fixent sur les PLP transpeptidases et inhibent, de ce fait, la transpeptidation et la biosynthèse du peptidoglycane. Les autolysines bactériennes sont alors activées et la mort bactérienne survient, accompagnée souvent par la lyse cellulaire[14].

Les PLP des bactéries sont différentes chez les germes à Gram positif, à Gram négatif et chez les bactéries anaérobies. Les bêta-lactames sont efficaces uniquement chez les bactéries en phase de croissance cellulaire, c'est-à-dire, au moment où la division active des cellules et la biosynthèse de la nouvelle paroi cellulaire ont lieu[14].

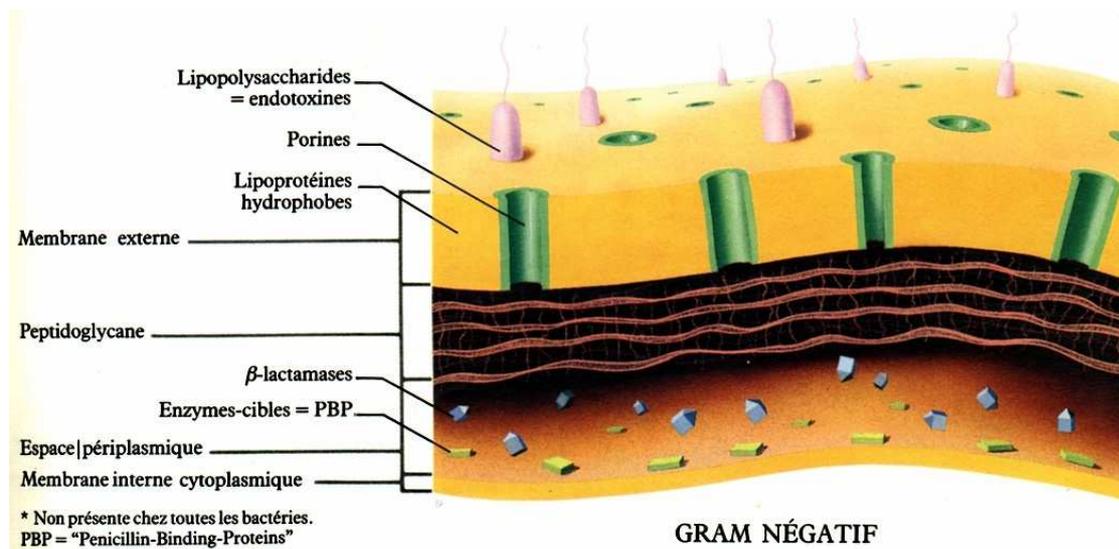


Figure 1 : Structure de la paroi [1].

II.2.3. Classification des β-lactamines

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactames, se subdivisent en trois sous-familles importantes, à savoir la sous-famille des penams, des céphems ou céphalosporines et des penems ou carbapénèmes. Les monobactams et les inhibiteurs des bêta-lactamases appartiennent également à cette famille [17].

La structure chimique commune aux antibiotiques de cette famille est l'anneau bêta-lactame

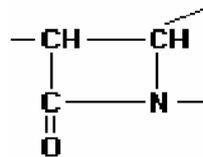
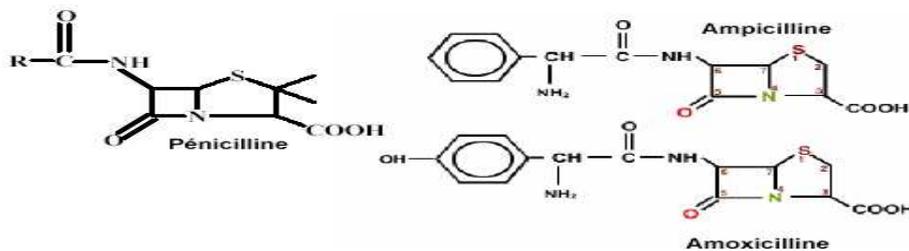


Figure2 : Structure chimique [20].

de l'anneau bêta-lactame

II.2.3.a. Penams

La sous-famille des penams comprend le groupe des pénicillines à spectre étroit (pénicilline G et V), des méthicillines (méthicilline, oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline, flucloxacilline), des pénicillines à spectre élargi (ampicilline, amoxicilline, ticarcilline) et enfin le groupe des uréidopénicillines (mezlocilline, azlocilline, pipéracilline) [17].



Figure

3 :Structure chimique de la pénicilline, de l'ampicilline et de l'amoxicilline. (20)

Les antibiotiques appartenant aux groupes des pénicillines à spectre étroit et des méthicillines sont actifs principalement sur les bactéries à Gram positif (*Streptococcus*, *Staphylococcus*). En revanche, les uréidopénicillines, ainsi que les pénicillines à spectre élargi sont actives à la fois contre les bactéries à Gram positif et négatif, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus*. (20)

II.2.3.b. Céphèmes ou Céphalosporines

Les céphalosporines sont des bêta-lactames à large spectre isolées du mycète Méditerranéen *Acremonium*. Le noyau chimique de base des céphalosporines est l'acide 7-aminocéphalosporanique. Ce noyau permet plusieurs possibilités de modifications de la molécule active, conférant la capacité de varier, à la fois le spectre antibactérien et les propriétés pharmacologiques de l'antibiotique [17].

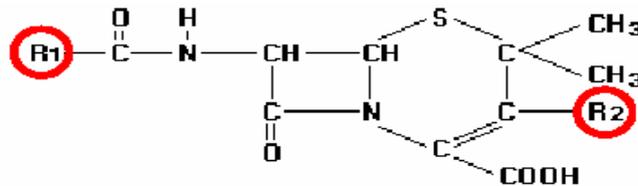


Figure4 : Acide 7-

aminocéphalosporanique, noyau de base des céphalosporines et ses deux principales possibilités de modifications : R1 affecte le spectre antibactérien, R2 les propriétés pharmacologiques. Source (20).

A ce jour, on distingue, sur la base de leur spectre d'action, 4 générations de céphalosporines comportant divers antibiotiques.

- **Les céphalosporines de la 1ère génération** : ils ont un spectre limité aux cocci à Gram positif, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinase inducible comme *E. coli*, les salmonelles, *P. mirabilis* ou *Klebsiella spp.* Elles sont hydrolysées facilement par les β -lactamases acquises [12].
- **Les céphalosporines de la 2ème génération** : ils ont un spectre un peu élargi au sein des entérobactéries, avec des variations suivant les molécules. Les céphamycines comme la céfoxitine et le céfotétan leur sont rattachées du fait de leur spectre très proche, étendu à certaines entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu et aux anaérobies à Gram négatif [12]
- **la 3ème génération** se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Cependant, en cas d'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique ou de production de β -lactamases à spectre élargi, ces céphalosporines sont inactivées. Elles sont par ailleurs moins efficaces sur les staphylocoques que les céphalosporines de première génération [12].

- **Enfin, les dérivés de la 4^{ème} génération** se caractérisent par une activité contre les coques à Gram positif augmentée et une activité contre les bactéries à Gram négatif demeurant excellente [12].

II.2.3.c. Pénèmes

Les pénèmes se distinguent par une substitution de l'atome de soufre du pentacycle pénème par un atome de carbone. Cette introduction du carbone dans le noyau pentagonal est à l'origine du terme de carbapénème. Les carbapénèmes assurent une stabilité importante vis-à-vis une grande variété de β -lactamases à l'action et augmente l'activité vis-à-vis d'espèce comme *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. et *Citrobacter* spp. L'imipénème est un carbapénème à spectre large actif contre les pneumocoques, *Haemophilus influenza* et les Gram négatifs [17].

II.3. Quinolones

II.3.1. Définition

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides, dérivés de la quinoléine ou des isostères de ce noyau. Il s'agit de molécules planes qui possèdent deux cycles aromatiques accolés. Le premier est un cycle pyridine, le deuxième est un hétérocycle (pyridine ou pyrimidine) ou un benzène ; une fonction cétone en position 4 et une fonction carboxylique -COOH en position 3 (18) .

Les quinolones sont classées en 4 générations selon la chronologie de leur découverte et selon leur activité anti-bactérienne (18) :

- Les quinolones de première génération sont représentées par l'acide nalidixique et l'acide oxolinique.
- Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones (FQs) (le substituant R6 est un atome de fluor) sont représentées principalement par la fluméquine.
- Les quinolones de troisième génération, qui sont aussi des fluoroquinolones représentées par la péfloxacin, la norfloxacin et la sarafloxacin.

- Les quinolones de quatrième génération : comprenant la trovafloxacin, lamoxifloxacin et la gemifloxacin.

II.3.2. Les mécanismes de résistance aux quinolones

L'émergence de la résistance aux FQs a été reconnue 10 ans après leur introduction en thérapeutique, du fait notamment d'une large utilisation clinique [21]. La résistance aux quinolones peut être intrinsèque (naturelle) ou acquise [21].

II.3.2.a. Les résistances intrinsèques

Les résistances intrinsèques sont liées à l'affinité entre les quinolones et la cible (la topoisomérase IV chez les bactéries à Gram positif, et l'ADN-gyrase chez les bactéries à Gram négatif) [22] ou encore à la diminution de la concentration intracellulaire des quinolones (pompe à efflux) [23].

Les systèmes d'efflux bactériens jouent un rôle naturel dans la protection et la détoxication des cellules. Ces systèmes peuvent induire la résistance à un antibiotique ou à une classe donnée d'antibiotiques (pompe à efflux spécifique) [22]. Les pompes à efflux non-spécifiques, conférant une résistance multiple aux antibiotiques (Multi-Drug Resistance, MDR) causent le plus de problèmes sur plan clinique car elles peuvent effluer une grande variété de composés de structures chimiques différentes [24].

Chez les bactéries à Gram négatif pathogènes, 28 pompes à efflux ayant les FQs comme substrats ont été identifiées à ce jour. Ce sont toutes des pompes de type MDR, et la plupart appartiennent à la famille RND (Resistance Nodulation Division). Sept pompes sont des transporteurs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) et 3 de type MFS (Major Facilitator Superfamily). Seule une pompe est un transporteur primaire (famille ABC : ATP-Binding Cassette). Chez certaines bactéries, plusieurs pompes, généralement de différentes familles, ont été caractérisées et agissent de manière complémentaire pour effluer les antibiotiques, c'est le cas de *E. coli* [25].

II.3.2.b. Les résistances acquises

Les résistances acquises aux quinolones sont principalement à caractère chromosomique, s'exprimant par des mutations affectant les cibles des quinolones (l'ADN gyrase et la

topoisomérase IV), ou l'activation de l'expression des systèmes des pompes à efflux des quinolones. La résistance peut également être due à l'acquisition d'un plasmide de résistance [26].

II.3.2.b.1. Les résistances à médiation chromosomique

Deux mécanismes sont responsables des résistances à haut niveau des bactéries aux FQs (résistances cliniques avec des CMI au-delà de 1 à 2 µg/ml): (i) la modification de la conformation des topoisomérases suite à l'apparition de mutations au sein des gènes *gyr* ou par, ce qui diminue le degré de liaison des FQs au complexe topoisomérase-ADN ; (ii) la diminution de la concentration intracellulaire des FQs par une augmentation de l'activité de différentes pompes à efflux selon les espèces bactériennes concernées. Ces mécanismes de résistance peuvent se transmettre verticalement à la descendance, mais pas horizontalement à d'autres bactéries [26].

II.3.2.b.1.1. Modifications de la cible

Ces mutations affectent principalement le gène *gyrA*, puis le gène *gyrB* codant pour les sousunités A et B de l'ADN-gyrase [27]. Les mutations peuvent aussi concerner les gènes *parC* et *parE* codant pour les deux sous-unités de la topoisomérase IV [28].

➤ Modifications de l'ADN- gyrase

Les modifications décrites dans le *GyrA* d'*E.coli* concernent les acides aminés proches du site de fixation de la sous unité *GyrA*, elles s'étendent des positions 67 à 106 (c'est-à-dire la région déterminante pour la résistance aux quinolones (QRDR) [27].

Toutefois, certaines mutations situées à l'extérieur de la QRDR (position 51) peuvent aussi entraîner une diminution de la sensibilité aux quinolones [28].

➤ Modifications de la topoisomérase IV

Les mutations responsables de la modification de la topoisomérase IV, affectent les gènes *parC* et *parE* codant pour les deux sous-unités de la topoisomérase [29].

Pour le gène *parC*, les substitutions décrites chez *E. coli* concernent les codons 80, 84 et 78

Des substitutions affectant la position 79 ont été rapportées chez d'autres espèces :

Shigella flexneri (Asp pour Ala) , *Haemophilus influenzae* (Asp pour Asn) et *Streptococcus pneumoniae* (Asp pour Asn) [29].

Pour le *parE*, une seule substitution (Leu445 par His) a été décrite chez *E. coli* .

Les mutations sur parE ou parC font apparaître peu ou pas de phénotype de résistance chez les bactéries Gram-négatives tant que la DNA-gyrase n'a pas subi de mutation étant donné qu'elle est la cible principale des FQs chez ces bactéries [28].

II.3.2.b.1.2. Diminution de l'absorption cellulaire

Les quinolones traversent la membrane externe de deux façons: par le biais de porines ou par la diffusion à travers les phospholipides membranaires. Le degré de diffusion d'une quinolone est fortement associé à son hydrophobicité [27].

La membrane externe de la bactérie E. coli possède trois principales porines (OmpA, OmpC et OmpF) [27].

Les modifications de la perméabilité de la membrane aux quinolones décrite chez E. coli et d'autres bactéries Gram-négatives, sont généralement associées à la diminution d'expression des porines, à des modifications dans leur composition et / ou dans celle des lipopolysaccharides [27].

Une fois la barrière du lipopolysaccharide franchie, les quinolones doivent traverser la membrane externe. La porine OmpF est l'un des passages majoritaires. Une diminution d'expression de OmpF augmente la résistance à certaines quinolones, mais n'atteint pas la CMI d'autres quinolones, de la tosufloxacin ou de la sparfloracin. Les porines OmpF ne sont donc pas la seule voie d'accès des quinolones [28].

II.3.2.b.1.3. Augmentation de l'expulsion

L'hyper-expression de système d'efflux chez des mutants entraîne une augmentation de la résistance aux quinolones tels que les systèmes AcrAB [25].

Chez E. coli, les opérons MarRAB (constitué par trois gènes: marR qui code pour une protéine répressive, marA, codant pour un activateur transcriptionnel et marB qui code pour une protéine avec une fonction inconnue) et SoxRS (opéron codant pour deux protéines, SoxR, un régulateur de protéines, et SoxS, un activateur transcriptionnel) réglementent les niveaux d'expression de certaines pompes à efflux comme la AcrAB. Les mutations qui affectent l'opéron MarR, induisent une expression constitutive de cet opéron, ce qui engendre un phénotype de multirésistance [28].

II.3.2.b.2. La résistance plasmidiques aux quinolones

Trois mécanismes de résistance aux quinolones médiés par des gènes plasmidiques ont été décrits. Dans l'ordre chronologique de leur description, ils' agit des gènes *qnr* (protection de la cible), *aac (6')-Ib-cr* (inactivation de l'antibiotique) et *qepA* (efflux actif) [27].

II.3.2.b.2.1. Le gène *qnr* : protection de la cible

II.3.2.b.2.1.1 Protéines Qnr

Le premier mécanisme plasmidique de résistance aux quinolones (PMQR) a été rapportée aux USA en 1998 [25]. Le plasmide pMG252 trouvé chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* porte le gène *qnr* (quinolone résistance) codant une protéine de 218 acides aminés (QnrA) décrite pour la première fois en 2002 [24].

A ce jour cinq, Qnr ont été mises en évidence, QnrA, QnrB, QnrS, QnrD et QnrC [25,26,30,24,31].

Il existe différents variant des gènes *qnr* d'après la banque des données de séquence GenBank® du Centre National de l'information Biotechnologique (NCBI) : 6 variants de QnrA, 4 variants de QnrS et 21 variants de QnrB [30].

Les protéines Qnr appartiennent à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. Cette famille compte plus de 500 protéines connues, dont MfpA qui possède, à peu près, 19% d'homologie avec Qnr. Un variant de MfpA chez *Mycobacterium tuberculosis* peut inhiber l'activité de l'ADN gyrase. En effet, la structure tridimensionnelle de MfpA est proche de celle de l'ADN. La protéine agit comme un leurre pour l'ADN gyrase. Cette dernière ne se retrouve plus impliquée dans la formation du complexe ternaire ADN-Quinolone-ADNgyrase qui bloque la progression de l'ADN polymérase. La bactérie résiste ainsi à l'effet létal des quinolones. La protéine Qnr agirait de la même façon: elle entre en compétition avec les quinolones pour la fixation de l'ADN gyrase [29].

II.3.2.b.2.1.2 Distribution et origine du gène *qnr*

Les études sur la prévalence de ce gène montrent qu'il a une répartition mondiale, détecté chez des souches en Amérique, en Europe, en Asie et en Afrique, chez des espèces d'entérobactérie, notamment *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp,



Providencia stuartii, *Salmonella* spp, *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* [33; 31; 25 ; 34]. Par ailleurs, *qnr* a été récemment découvert chez une bactérie n'appartenant pas à la famille des *Enterobacteriaceae* ; *Acinetobacter baumannii* [34].

Le gène *qnrA* (*qnrA2-qnrA5*) à été localisé d'abord sur le chromosome de différentes espèces de *Shewanella* et de *Vibrio* d'origine environnementale [32]. En outre, deux nouveaux gènes ; *qnrVS1* et *qnrVS2* ont été identifiés respectivement chez des isolats de l'environnement aquatique : *Vibro splendidus* et *Vibro* spp.

Ces résultats indiquent que les bactéries Gram-négatives du milieu aquatique peuvent constituer la source et le réservoir des gènes *qnr* [30].

Les bactéries donatrices, qui sont généralement des isolats cliniques, expriment le plus souvent des plus hauts niveaux de résistance aux quinolones que les transconjugants. Ceci peut être expliqué par la coprésence d'autres mécanismes de résistance chromosomique aux quinolones, en particulier des mutations dans le QRDR de gènes *gyrA* et *parC* [37,30]. Dans certains cas, les différences de niveaux de résistance parmi les transconjugants peuvent être dues au transfert d'autres mécanismes de résistance plasmidique, tels que l'enzyme AAC (6')-Ib-cr [30].

II.3.2.b.2.2 Le gène *aac* (6')-Ib-cr : inactivation enzymatique par acétylation.

Un deuxième gène de résistance plasmidique a été mis en évidence chez *E.coli* en 2006 [30]. Il est dû à l'apparition de deux mutations (Trp102Arg et Asp169Tyr) dans le gène *aac* (6')-Ib (sauvage), qui code à l'origine, pour un aminoglycoside acétyltransférase, responsable d'une résistance à la tobramycine, à l'amikacine et à la kanamycine de la famille des aminoglycosides. Suite à ces deux mutations, un variant de ce gène est apparu, *aac*(6')-Ib-cr (cr: ciprofloxacine résistance), il code pour l'enzyme qui est maintenant capable de N-acétyler le cycle piperazinyl au niveau du groupement amine secondaire de la ciprofloxacine et la norfloxacine [35]. Les autres fluoroquinolones lui sont insensibles du fait de leurs structures chimiques différentes. ACC-(6')-Ib-cr est la première enzyme décrite qui inactive deux antibiotiques de familles différentes (aminoglycosides et quinolones) [35].

L'épidémiologie de ce gène n'est pas encore bien étudiée [36]. Il est bien répandu en Chine et en Amérique du Nord dans des souches d'*Enterobacteriaceae* avec des prévalences respectives de

50% et 14%. À Shanghai il à été également mis en évidence chez 50% des 78 *E. coli* résistantes aux FQ avec des associations aux gènes *qnr*.

Le niveau de résistance aux quinolones conféré par le gène *aac (6')-Ib-cr* est faible (la CMI de la ciprofloxacin varie entre 0,04 µg/ml et 0,08 µg/ml chez le transconjugant). Néanmoins, sa présence augmente significativement la concentration préventive des mutants (CPM) de 0,2 µg/ml à 3,2 µg/ml [37].

II.3.2.b.2.3 Le gène *qepA* : efflux actif

Le mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones par efflux actif à été découvert récemment en 2007. Il a été décrit d'abord chez une souche d'*E.coli* isolée en Japon, puis en Belgique [35]. Le gène *qepA* (quinolone efflux pumps) est de l'ordre de 1537pb, ayant un pourcentage GC de 72 [36]. Deux variants du gène *qepA* sont décrits actuellement, gène *qepA1* et gène *qepA2*. Le variant *qepA2* se caractérise par deux substitutions nucléotidiques conduisant à des changements dans la Ala99Gly et Val 134Ile. Il confère un phénotype similaire à celui de *qepA1* [37].

II.3.2.b.2.3.1 Protéine QepA

Le gène *qepA* code une protéine QepA (511 acides aminés) à 14 domaines transmembranaires (14-TSM) appartenant à la famille des MFS. Cette famille assure le symport, l'antiport et l'uniport de divers substrats, tels que les sucres, des métabolites intermédiaires et des antibiotiques [30]. Les protéines d'efflux des antibiotiques sont constituées d'un unique polypeptide [32]. Plusieurs motifs sont conservés parmi les différents systèmes d'efflux des antibiotiques de la famille MFS. Quatre motifs sont communs aux protéines à 14 TMS [31]:

- le motif A est situé dans la boucle entre les TMS 2 et 3 et dans une forme dégénérée, entre les TMS 8 et 9 de certaines protéines à 12 TMS

- le motif B est situé dans le TMS 4.

Les motifs A et B sont conservés au sein de tous les membres de la famille MFS.

- le motif C, également appelé motif consensus d'expulsion des drogues, se trouve à la fin du TMS 5.

- le motif D est retrouvé dans le TMS 1, avec quelques variations selon le nombre de TMS des protéines.



Le motif A serait responsable de changements conformationnels de la protéine qui permettraient le transport du substrat [37] ; le motif B pourrait avoir un rôle dans le couplage énergétique [35]. Quant au motif C, présent uniquement chez les pompes d'efflux des antibiotiques de cette famille, il serait requis pour coupler le transport des protons avec l'efflux des antibiotiques, et au final imposerait la direction du transport des substrats (antiport) [35]. Les motifs E, F et H sont spécifiques des protéines à 14 TMS (bien que le motif H se retrouve dans une forme dégénérée chez certaines pompes à 12 TMS). Le motif G est lui,

spécifique des protéines à 12 TMS et correspond probablement à une duplication C-terminale du motif C (35).

II.3.2.b.2.3.2 Activité du QepA

Le gène *qepA* augmente jusque 0,25 µg/ml la CMI vis-à-vis des fluoroquinolones hydrophiles, dont la norfloxacin, la ciprofloxacine et l'enrofloxacin (5 à 64 fois)) [30,34].

II.3.2.b.2.3.3 Origine de QepA

La séquence des acides aminés de QepA montre une similitude avec les transporteurs membranaires des actinomycètes, tels que *Nocardia farcinica* (51%), *Streptomyces globisporus* (49%), et *Streptomyces clavuligerus* (46%) [30].

L'une des hypothèses la plus acceptée à ce jour, indique que l'origine du gène *qepA* est l'environnement du sol. La contamination de l'environnement avec des fluoroquinolones lors des traitements vétérinaires pourrait suggérer leur accumulation dans le sol du fait qu'ils sont fortement absorbés et pas facilement biodégradés. Des pressions de sélection de certains micro-organismes du sol ne sont pas exclues [34].

III. Mécanisme de résistance des entérobactéries aux antibiotiques.

III.1. Définition de la résistance

La résistance bactérienne est prise dans sa définition «clinique», synonyme de risque d'échec thérapeutique, c'est-à-dire la capacité à se multiplier en présence d'une concentration d'antibiotique égale ou supérieure à celle que l'on peut obtenir in vivo. La résistance aux antibiotiques est un problème mondial qui ne connaît pas de frontière [38]. Les bactéries

développent au cours de leur existence des multiples mécanismes pour échapper à l'action létale des antibiotiques.

Dans le contexte d'utilisation de ces molécules, quelques points importants sont à décrire. Nous retrouvons des personnes qui cessent un traitement aux antibiotiques avant le temps. Ceci permet aux bactéries sensibles d'être éliminées et laisse place aux souches résistantes leur permettant de se multiplier. En clinique nous retrouvons l'application de doses inadéquates d'antibiotiques amenant une concentration de l'antibiotique inférieure aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) et aux concentrations sériques inappropriées pour permettre l'élimination du pathogènes en question. Cette concentration inférieure exerce une pression sélective permettant l'apparition de clones résistants qui existaient déjà dans la population bactérienne [39,40,41]

III.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

Il existe Plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques :

- ✓ La bactérie peut acquérir des gènes codant pour des enzymes, telles que les β -lactamases, qui détruisent l'antibiotique avant d'avoir un effet.
- ✓ La bactérie peut acquérir des pompes à efflux qui expulsent l'antibiotique de la cellule avant d'atteindre sa cible et exercer son effet.
- ✓ La bactérie peut acquérir plusieurs voies métaboliques qui, modifient sa paroi cellulaire ne contenant plus de site de la liaison de l'antibiotique,
- ✓ La bactérie peut acquérir des mutations qui, limitent l'accès des antibiotiques au site cible intracellulaire [16].

III.2.1. Mécanismes de résistance chromosomique

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques, par une mutation spontanée au niveau du gène cible dans le chromosome, à la suite d'un changement dans la séquence des acides nucléiques, ce qui rend impossible l'interaction avec l'antibiotique. Elles le deviennent aussi, suite à une recombinaison qui est due à un transfert des fragments de gènes d'un endroit du chromosome bactérien à un autre. Il s'agit d'intégrons lorsque leur incorporation s'effectue à des endroits bien précis, ou de transposons quand ils se déplacent[19].

III.2.2. Mécanismes de résistance extra-chromosomique

Les bactéries peuvent acquérir un matériel génétique étranger via des plasmides, des bactériophages ou des transposons, les mécanismes utilisés sont la conjugaison, la transduction et la transformation [19].

La résistance aux β -lactamines est principalement due à la production d'enzymes beta-lactamases, capables d'hydrolyser le noyau bêta-lactame commun à cette classe d'antibiotiques [53].

III.3. Résistance aux beta-lactamines.

Les entérobactéries ont la capacité de produire des β -lactamases, enzymes qui inactivent les antibiotiques β -lactamines par ouverture du cycle β -lactame. Ce mécanisme fait partie des mécanismes classiques de résistance bactérienne, comme en font également partie l'imperméabilité membranaire et la modification de la molécule cible sur laquelle se fixe l'antibiotique [39].

Les gènes de résistance des β -lactamases se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra chromosomiques [39].

III.3.1. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été observés chez les entérobactéries, que ce soit par la production β -lactamases, modification de la cible (protéines cibles liants la pénicilline : PLPs), imperméabilité de la paroi ou élaboration de mécanismes d'efflux [11].

III.3.1.a. Modification d'affinité de la cible

Un des mécanismes de résistance aux antibiotiques bêta-lactamines est la modification des protéines cibles liants la pénicilline (PLP) : ceci peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux bêta-lactamines [40]. Ce dernier phénomène se trouve principalement chez les bactéries à Gram-positif. Les PLPs sont responsables de la polymérisation des molécules précurseurs disaccharides-pentapeptides impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire peptidoglycane. Les bêta-lactamines se lient sur les PLPs et empêchent la synthèse de la paroi cellulaire [41].



III.3.1.b. Mécanisme d'imperméabilité

Pour atteindre leurs cibles à la surface de la membrane cytoplasmique, les β -lactamines doivent diffuser aux travers de canaux spécialisés appelés porines. La diffusion est fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules [43]. Les β -lactamines touchées diffèrent selon la porine absente. La disparition de porine provoque l'augmentation des CMI de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli*) [43].

III.3.1.c. Mécanisme d'efflux

Ceci est dû à un seul gène ou un opéron codant pour une pompe « efflux ». [24] La faible perméabilité membranaire bactérienne et l'hydrolyse par les β -lactamases chromosomiques ne peuvent expliquer l'ensemble des résistances naturelles de certaines bactéries, en particulier vis-à-vis de certaines familles d'antibiotiques qui ne subissent pas de dégradation intracellulaire comme les quinolones, les cyclines ou les sulfamides. La découverte des pompes d'efflux actif est venue combler ce vide. L'existence de tels systèmes a été décrite initialement chez des bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *P. aeruginosa*, puis plus récemment chez les bactéries à Gram positif. Ces pompes habituellement utilisées par la bactérie pour ses échanges avec le milieu extérieur présentent toutes la même organisation chez les bactéries à Gram négatif, faite de l'association de trois composants protéiques : un transporteur inséré dans la membrane cytoplasmique (la pompe proprement dite), une protéine dans la membrane externe et une protéine de liaison périplasmique qui relie entre elles les deux autres protéines [9].

III.3.1.d. Mécanisme enzymatique

Le mécanisme le plus commun dans la résistance aux bêta-lactamines est la production de bêta-lactamases. Ces enzymes inactivent les bêta-lactamines en hydrolysant l'anneau bêta lactame de l'antibiotique [45]. Ce mécanisme enzymatique est important et très varié ainsi qu'en témoignent tout particulièrement, les Bêta-lactamases, au moins 600 enzymes identifiées maintenant.

IV. Les β -lactamases

IV.1. Généralité

Les β -lactamases sont un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les β -lactamines. L'inactivation survient après ouverture du cycle β -lactam par l'enzyme, structure commune à toutes les molécules de cette famille. L'enzyme hydrolyse le pont amide du cycle β -lactame pour donner une acyl-enzyme qui sera ensuite dégradée en acide inactif.

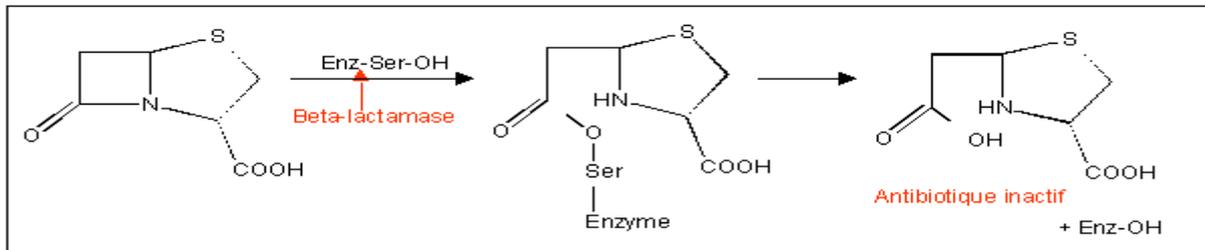


figure5 : Mode d'action d'une bêta-lactamase de type sérine enzyme [46]

Elles constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux β -lactamines et ont été à l'origine des premières résistances acquises dès l'apparition des antibiotiques au début des années 1940 : la première résistance par pénicillinase plasmidique à la pénicilline G est décrite chez *S. aureus* dès 1944. En 1955, la résistance naturelle de nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif par production d'une céphalosporinase inductible est mise en évidence. En 1965, les premières β -lactamases plasmidiques de type TEM sont décrites chez les entérobactéries et, en 1974, le transfert de ces β -lactamases à des espèces bactériennes différentes par transposition est mis en évidence, expliquant leur diffusion [9]. Mondialement, les bactéries retrouvées en cliniques possèdent des variétés de β -lactamases. Leur déterminant génétique peut être transféré d'une cellule à une autre. Nous retrouvons même des transferts de déterminant génétiques à travers les barrières d'espèces et de genres bactériens[45].

IV.2. Les β -Lactamases à Spectre Etendu (BLSE)

IV.2.1. Définition

Les BLSE sont des enzymes capables d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines (céfoxitine, céfotétan) du moxalactam et des carbapénèmes [45] de

plus elles sont sensibles aux inhibiteurs (acide clavulanique et tazobactam). Elles ont été découvertes dans les années 80 en France, puis en Allemagne. Elles sont retrouvées essentiellement chez les Entérobactériacae, principalement *Escherichia coli* et *Klebsiella* [47].

IV.2.2. Classification des BLSE

Les classifications des BLSE les plus utilisées et qui sont considérées comme les plus pertinentes sont la classification d'Ambler et la classification de Bush-Jacobi-Medeiros [45].

IV.2.2.a. Classification d'Ambler

C'est la première classification qui a été proposée en 1980 par Ambler. Elle est basée sur l'homologie des séquences des acides aminés et divise les BLSE en quatre groupes :

- Les groupes A, C et D : contenant les β -lactamases avec la sérine dans son site actif.
- Le groupe B : contient des enzymes contenant deux atomes de Zinc au site actif, d'où leur appellation métallo-béta-lactamases, qui hydrolysent les carbapénèmes [48].

IV.2.2.b. La classification de Bush-Jacobi-Medeiros

Cette classification est basée sur des propriétés fonctionnelles des enzymes, elle a été proposée en 1989 et remise à jour en 1995. Elle est constituée de quatre groupes :

- **Le groupe 1** : correspond à des céphalosporinases chromosomiques, peu inhibées par l'acide clavulanique [55].
- **Le groupe 2** : est composé de pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases, et carbapénémases, chromosomiques inhibées par l'acide clavulanique [55].
- **Le groupe 3** : correspond à des métallo-enzymes, en général retrouvés chez les *Pseudomonas* spp., *Bacteroides* spp. et *Serratia marcescens*, peu inhibés par l'acide clavulanique[55].
- **Le groupe 4** : qui contient des enzymes divers, non entièrement séquencés et non inhibés par l'acide clavulanique. [55]

IV.2.3. Les types de BLSE produites par *Enterobacteriaceae*

IV.2.3.a. BLSE de type TEM

Les BLSE de type TEM (Temoniera , nom du patient) est fréquemment retrouvés chez *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Elles ont aussi été rapportées parmi les autres Entérobactéries et



pseudomonas aeruginosa. La majorité de ce type de BLSE dérive des mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2) qui rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G [56].

IV.2.3.b. BLSE de type SHV

Les BLSE de type SHV (Sulphydryl variable) ont été détectées parmi de nombreuses Entérobactéries notamment *K. pneumoniae* mais aussi chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter*, ces enzymes dérivent elles aussi des mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1[56,47].

IV.2.3.c. BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M (Céfotaximases-Munich) hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases. Elles confèrent une résistance marquée au céfotaxime, elles ont été décrites initialement au Japon en 1986, puis en Allemagne et en France en 1989.

Les BLSE de type CTX-M ont été retrouvées chez *E. coli* et *Salmonella enterica*, leur émergence parmi d'autres espèces d'Entérobactéries est rapide .Il semble qu'elle dérivent des céphalosporinases chromosomiques des bactéries du genre *Kluyvera*, qui sont des Entérobactéries non pathogènes environnementales [47,56].

IV.2.3.d. BLSE de type OXA

Les BLSE de type OXA (Oxacilline) sont caractérisées par une grande activité catalytique vis à vis des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline). Les oxacillines hydrolysent la céftazidime mieux que le céfotaxime, elles ont été fréquemment observés chez *Pseudomonas aeruginosa* et les Entérobactéries particulièrement en France et en Turquie [47,56]

IV.2.3.e. Autres types de BLSE

Il existe d'autres types de BLSE mais qui sont très rares.

IV.2.3.e.1. BLSE type PER

L'enzyme PER-1(*Pseudomonas extended* résistance), initialement découverte en 1993 chez *P. aeruginosa* en Turquie, est fréquente chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. Elle a été détectée



aussi chez d'autres bactéries, PER-2 a été détectée en 1996 en Amérique du Sud chez *S. enterica* sérovar *Typhimurium* en Argentine [48].

IV.2.3.e.2. BLSE type VEB

L'enzyme VEB-1 (**V**ietnamiense **e**xtended-spectrum **β** -lactamase -1) (38 % d'identité avec PER-1) a été retrouvée en 1996 dans une souche d' *E. coli*, isolée chez un patient vietnamien. Puis chez *P. aeruginosa* en Thaïlande : 4 dérivés de VEB-1 ont aussi été décrits (VEB-2 à VEB-5). Le gène codant pour VEB-1 est souvent localisé au sein d'un intégrom et peut donc être associé à d'autres gènes de résistance [48].

IV.2.3.e.3. BLSE type GES

Les BLSE de type GES (**G**uyana **e**xtended-spectrum **β** -lactamase) sont de plus en plus rapportées chez les BGN, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*. GES-1 a été initialement décrite chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en 1998 en France, puis en Argentine, au Brésil, au Portugal et aux Pays-Bas [48].

IV.2.3.e.4. BLSE type SFO

L'enzyme SFO (*Serratia fonticola*) n'a été détectée qu'une seule fois dans une souche de *Entérobacter cloacae* isolée au Japon en 1988 [48].

IV.2.3.e.5. BLSE type TLA

L'enzyme TLA-1 (**T**EM **L**ike **A**ctivity) a été décrite dans une souche d'*E. coli* isolée au Mexique en 1993. Depuis, plusieurs cas de bactériémies et d'infections urinaires nosocomiales dues à une souche de *K. pneumoniae* produisant à la fois SHV-5 et TLA-1 ont été rapportés au Mexique [48].

V. Autres enzymes de résistance aux bêta-lactamines

V.1. Céphalosporinases

Les Céphalosporinases sont des bêta-lactamases qui hydrolysent préférentiellement les céphalosporines, mais leur spectre inclus aussi les pénicillines et les monobactames qui sont plus faiblement hydrolysés. Elles sont codées par un gène chromosomique [49].



V.2. Les Carbapénémases

Les carbapénémases représentent une vaste famille de béta-lactamases, dont le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, elles hydrolysent toutes les carbapénèmes (imipénème, ertapénème et méropénème). Ces dernières sont limitées à un usage hospitalier, prescrites majoritairement dans le cadre du traitement d'infections nosocomiales [59].

Ainsi, on distingue des métallo-béta-lactamases (classe B), des oxacillinases à spectre étendu (classe D) et des carbapénémases, dont l'activité est inhibée par l'acide clavulanique (classe A). Les plus importantes cliniquement, sont actuellement les béta-lactamases de type KPC, IMP/VIM et OXA-48 [59].

VI. Mécanismes de dissémination des entérobactéries productrices de BLSE

La dissémination de souches d'entérobactéries productrices de BLSE est un phénomène complexe qui procède de trois mécanismes. Le premier mécanisme est la dissémination clonale, dans laquelle une souche productrice de BLSE peut se disséminer par contact horizontal de patient à patient. Le second mécanisme est la transmission d'un ou plusieurs plasmides vers une autre souche (de la même espèce ou d'une espèce différente). Le troisième mécanisme est le transfert d'éléments de résistance présents dans des transposons ou intégrons entre différents plasmides. La transmission peut produire des épidémies locales au niveau d'une unité de soins intensifs, d'un hôpital ou un centre de soins. Elle peut s'étendre au niveau inter hospitalier par le transfert de patients colonisés ou infectés [39].

VII. Facteurs de risque :

En général, l'acquisition de bactéries productrices des BLSE concerne des patients gravement malades, suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des dispositifs invasifs (cathéters veineux, sonde urinaire ou tube endotrachéal). D'autres facteurs de risque sont la malnutrition, l'hémodialyse, la nutrition parentérale totale, l'admission en réanimation ou l'hospitalisation préalable [48].



Le premier facteur qu'on peut relever concerne l'utilisation accrue des antibiotiques de type céphalosporines de 3ème génération quelques années avant l'apparition des premières BLSE, et par conséquent, la mise en évidence d'un lien de causalité entre cette utilisation et l'émergence des BLSE[48].

En effet, les antibiotiques agissent à plusieurs niveaux : ils peuvent par exemple, transformer la flore habituelle des patients, favoriser la colonisation par des bactéries résistantes ou encore sélectionner des souches résistantes et faciliter leur dissémination. En d'autres termes, les antibiotiques exercent une pression de sélection non négligeable [58] et cette pression de sélection est d'autant plus marquée que le nombre de patients traités est important et que la durée de l'antibiotique est longue. De plus, on peut constater que la restriction de l'utilisation des antibiotiques a permis la diminution du nombre de BLSE [58].

Le deuxième facteur de risque concerne la dissémination des souches résistantes et englobe d'une part le problème des « réservoirs » et d'autre part le problème de la transmission des germes. Lorsqu'on parle d'infections nosocomiales, on est tenu d'identifier les différents réservoirs potentiels de bactéries, à savoir les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel médical et l'environnement [58].

Enfin, il convient de prendre en considération le rôle de la circulation des patients. Cette circulation peut avoir lieu entre des unités différentes d'un même hôpital, mais aussi entre hôpitaux, sur le plan national ou international, ce qui soulève le problème de l'importation de germes résistants et la nécessité des mesures de prévention [58].

Objectifs d'étude



❖ Objectifs principaux

Le but de cette présente étude est la caractérisation des gènes de résistance aux Béta-lactamines des entérobactéries productrices de beta-lactamases a spectre étendu d`origine communautaire collectées à partir de laboratoires d`analyse médicale.

Objectifs spécifiques

- Étudier la répartition des entérobactéries responsables d'infections communautaires dans la région de TAZA ;
- Évaluer la sensibilité de ces souches aux antibiotiques ;
- Etudier la prévalence des entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ;
- Identifier et décrire la résistance aux beta-lactamines par mécanisme plasmidique parmi les entérobactéries BLSE.
- typer les enzymes BLSE produites et rechercher la coexistence avec d'autre gène de résistance ;
- Etudier la mobilité du support génétique des gènes de résistance par conjugaison
- Etudier la relation épidémiologique entre les entérobactéries productrices de BLSE



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biolog



Matériel et méthodes



I. Souches étudiées:

L'étude a porté sur un total de 84 souches d'entérobactéries collectées des infections communautaires, recueillies de laboratoires privés d'analyses médicales de Taza, durant une période de quatre mois (de septembre à décembre 2011)

Les souches sont transportées dans une gélose de conservation à l'Institut Pasteur du Maroc.

II. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Le repiquage des souches est réalisé sur des milieux gélosés tels que Luria-Bertani ou Plate Count Agar.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu Luria-Bertani, une suspension bactérienne est préparée et ajustée au standard McFarland 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/ml). Un inoculum bactérien, obtenu par dilution au $1/10^{\text{ème}}$ est ensemencé par écouvillonnage sur la gélose de Muller-Hinton. Des disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose. L'incubation est menée à 37°C pendant 18 h à 24h.

Lors de notre étude, différents antibiotiques ont été testés : Amoxicilline (AMX) (25 μg), Amoxicilline+Acide Clavulanique (AMC) (20/10 μg), Céfoxitine (FOX) (30 μg), Céfotaxime (CTX) (30 μg), Céfotazidime (CAZ) (30 μg), Amikacine (AN), Gentamicine (GM) (10 μg), Tobramycine (TM) (10 μg), Imipénème (IPM) (10 μg), Acide Nalidixique (NA) (30 μg), Ciprofloxacine (CIP) (5 μg), Cotrimoxazole (SXT) (1,25/23,75 μg) et Aztréonam (ATM) (30 μg). Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

Les diamètres d'inhibition de croissance sont alors mesurés. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche est dite sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique concerné (annexe 2).

II.1. Détection des souches BLSE

II.1.1. Le test de synergie

Les enzymes bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) ont été détectées par la technique de synergie décrite [60]. Elle a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller Hinton (Diagnostic Pasteur) inoculé par une suspension bactérienne ajustée à 0,05 McFarland. Les disques chargés par 30µg (céfotaxime, ceftazidime et aztréonam) sont déposés à une distance de centre à centre de 20 à 30mm de celui d'amoxicilline-acide clavulanique (20/10µg). La présence d'une BLSE se traduit par l'appariation d'une synergie entre les disques des oxyimino-bêta-lactamines et le disque contenant l'acide clavulanique. Cette synergie se matérialise par une image en forme de bouchon de champagne (effet potentialisateur de l'acide clavulanique).

II.1.2. Test de confirmation : double diffusion

En cas de l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération ou de monobactam.

Le test de confirmation de double diffusion utilisant la comparaison des diamètres obtenus avec les disques de céfotaxime à 30 µg sans et avec de l'acide clavulanique à 10 µg. Elle a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller Hinton (Diagnostic Pasteur) inoculé par une suspension bactérienne ajustée à 0,5 McFarland. Le test confirmation est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de CTX avec l'acide clavulanique est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de CTX sans l'ajout de l'acide clavulaique. En cas de production de céphalosporinase de classe C, responsable d'une diminution de la sensibilité à la cefoxitine, les tests de synergie peuvent se révéler faussement négatifs. En utilisent des disques d'antibiotiques contenant de CTX sans et avec l'acide cluvulaniques et la cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases de classe C).

III. Etude génotypique

Cette partie a porté d'une part sur le dépistage des gènes de résistance aux β -lactamines et quinolones à médiation plasmidique et d'autre part sur la recherche des intégrons de classe I chez les entérobactéries productrices de BLSE.

III.1. Extraction de l'ADN total

L'ADN total a été extrait par choc thermique : pour chaque souche, deux à trois colonies ont été dissociées dans 500 μ l d'eau ultra pure; cette suspension a été chauffée à 100°C pendant dix minutes, puis refroidie immédiatement dans de la glace. Après deux minutes de centrifugation à 13 000 tours par minute, le surnageant est transféré dans un tube puis stocké à -20° C jusqu'à utilisation.

III.2. Typage moléculaire des gènes BLSE produits

Cette technique est utilisée afin de mettre en évidence le type du gène de bêta-lactamase responsable de la résistance aux bêta-lactamines. Elle est basée sur des simples polymérisations en chaîne utilisant des amorces spécifiques et selon des programmes appropriés.

L'amplification comporte trois étapes : La dénaturation de l'ADN double brin par la chaleur à 94°C, l'hybridation amorce-ADN et l'élongation. Cette dernière est catalysée par la Taq polymérase (ADN polymérase extrait des bactéries *Thermus aquaticus*). Chaque produit de la réaction d'élongation servant de matrice à la réaction suivante, une série de 30 cycles consécutifs conduit à l'accumulation exponentielle du fragment répliqué.

TABLEAU 3 : LES AMORCES UTILISEES POUR AMPLIFIER LES SEQUENCES D'INTERET

| Beta-lactamases | Amorces | Séquence en base du primer | Taille du gène amplifiée |
|-----------------|-----------|------------------------------|--------------------------|
| CTX-M | CTX-M1(+) | 5`-GGTTAAAAAATCACTGCGTC-3` | 863 pb |
| | CTX-M1(-) | 5`-TTGGTGACGATTTTAGCCGC-3` | |
| SHV | OS-5(+) | 5`-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3` | 795 pb |
| | OS-5(-) | 5`-GATTTGCTGATTTTCGCTCGG-3` | |
| TEM | a 216(+) | 5`-ATAAAATCTTGAAGACGAAA-3` | 1079 pb |
| | a 216(-) | 5`-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3` | |
| OXA-1 | Oxa-1 (+) | 5`-CCAAAGACGTGGATG-3` | 440 pb |
| | Oxa-1(-) | 3`-AAATTCGACCCCAAGTT-5` | |

Les gènes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} et *bla*_{CTX-M} ont été amplifiées en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 3) à partir de l'ADN total. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Perkin Elmer Gene) dans un volume réactionnel de 50µL contenant 2µL de l'ADN des souches; 0,4µM de chaque amorce; 100 µM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP); 2U de Taq DNA polymérase ;2,5 mM de MgCl₂ et 5 µl tampon 10 X de PCR (Promega, Madison,USA) suivant les programmes figurant sur le (Tableau 4).

Tableau4 : Les conditions d'amplification des gènes codant pour des bêta-lactamases

| Type de beta-lactamase | Etape initiale | Dénaturation/hybridation/élongation | Nombre de cycles | Etape finale |
|------------------------|----------------|--------------------------------------|------------------|--------------|
| CTX-M | 94 °C 5min | 94 °C 1min/60 °C1min/72 °C 1min | 30 | 72 °C 7 min |
| SHV | 94 °C 5min | 94 °C 1min/60 °C1min/72 °C 1min | 30 | 72 °C 7 min |
| TEM | 94 °C 5min | 94 °C 1min/50C1min/72 °C 1min | 30 | 72 °C 7 min |
| OXA-1 | 94°C 5min | 94 °C 1min /58 °C 1min / 72 °C 1 min | 30 | 72 °C 7 min |

III.3. Dépistage des gènes codant pour de céphalosporinase plasmidique de type Amp C

Les gènes ampC plasmidiques dérivent de gène chromosomique présent chez certaines entérobactéries. Actuellement, 92 gènes différents de β-lactamases plasmidiques de type AmpC(61) Pour amplifier ces gènes, nous avons utilisé les amorces décrites par (59) qui permettent d'amplifier les différents variants de chaque famille de gènes blaAmpC plasmidiques (tableau6).

Au laboratoire, nous disposons de quatre témoins positifs :

CIT, MOX, DHA et EBC.

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Perkin Elmer Gene) dans un volume réactionnel de 100µL contenant 2µL de l'ADN des souches; 0,4µM de chaque amorce; 100 µM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP); 2U de Taq DNA polymérase (Pomega, Madison ,USA); 2,5 mM de MgCl₂ et 5 µl tampon 10 X de PCR (Promega, Madison,USA). L'ADN a été amplifié selon le programme: une dénaturation 3 minutes à 94°C avec 25 cycles [dénaturation 30 secondes à 94°C, hybridation 30 secondes à 64°C, une élongation de 72°C pendant 1 minute] et une extension finale de 72°C pendant 7 minutes.

Tableau5 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes plasmidiques de type AmpC.

| Cible | Amorces | Sequence (5'--> 3) | Taille de l'amplicon (pb) |
|--------------------------|---------|------------------------|---------------------------|
| <i>bla_{FOX}</i> | foxM(+) | AACATGGGGTATCAGGGAGATG | 190 |
| | foxM(-) | CAAAGCGCGTAACCGGATTGG | |
| <i>bla_{ACC}</i> | accM(+) | AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA | 346 |
| | accM(-) | TTCGCCGCAATCATCCCTAGC | |
| <i>bla_{EBC}</i> | ebcM(+) | TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG | 302 |
| | ebcM(-) | CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT | |
| <i>bla_{MOX}</i> | moxM(+) | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT | 520 |
| | moxM(-) | CACATTGACATAGGTGTGGTGC | |
| <i>bla_{CIT}</i> | citM(+) | TGGCCAGAACTGACAGGCCAAA | 462 |
| | citM(-) | TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | |
| <i>bla_{DHA}</i> | dhaM(+) | AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT | 405 |
| | dhaM(-) | CCGTACGCATACTGGCTTTGC | |

Tableau 6 : Les conditions d'amplification des gènes codant pour AmpC

| Gènes | Etape initiale | Dénaturation/hybridation/élongation | Nombre de cycles | Etape finale |
|---------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|--------------|
| <i>bla_{AmpC}</i> | 94C 3 min | 94C 30s, 64C 30s, 72C 1min | 25 | 72C 7 min |

III.4. Dépistage des gènes de résistance plasmidique aux quinolones

III.4.1. Dépistage des gènes *qnr* par la PCR Multiplex

Le dépistage du gène *qnr* est réalisé par la technique de PCR Multiplex sur toutes les d'entérobactéries productrices de BLSE détectées, en utilisant les amorces spécifiques pour les gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* (Tableau). Les produits de PCR positifs ont été confirmés par PCR simplex.

Tableau7 : Les amorces des gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* utilisées

| Gène | Amorce | Séquence | Taille produit PCR |
|-------------|----------|-------------------------|--------------------|
| <i>qnrA</i> | qnrA (+) | TTCTCACGCCAGGATTTGAG | 571pb |
| | qnrA(-) | TGCCAGGCACAGATCTTGAC | |
| <i>qnrB</i> | qnrB(+) | TGGCGAAAAAATT(GA)ACAGAA | 594pb |
| | qnrB(-) | GAGCAACGA(TC)GCCTGGTAG | |
| <i>qnrS</i> | qnrS(+) | GACGTGCTAACTTGCGTGAT | 388pb |
| | qnrS(-) | AACACCTCGACTTAAGTCTGA | |

(+):amorce sens ; (-) : amorce antisens ; (TC) : soit la séquence contient le nucléotide T ou C

La PCR est faite dans un volume final de 100µl contenant 10µL de tampon PCR (10X), 5µl de MgCl₂ à 50 mM, les 4 dNTPs à 200 µM finale, 20 pmoles de chacune des deux amorces, 3 Unité enzymatique (Ampli Taq Gold; Applied Biosystem) et la matrice d'ADN à amplifier (2µL). Les conditions d'amplifications figurent dans le (tableau 8).

III.4.2. Dépistage de gène *qepA* par la PCR simple

La recherche du gène *qepA* a été réalisée sur toutes les souches, avec l'utilisation des amorces spécifiques permettant d'amplifier les variants décrits *qepA1* et *qepA2* :

qepA (sens) : 5'TGGTCACGCCATGGACCTCA3' ;

qepA (antisens) : 5'TGAATTCGGACACCGTCTCCG3' ;

conçus pour amplifier un fragment de 1137pb.

La souche de référence (contrôle positif) utilisée est : *E.coli* TOP10/pAT791.

Le mélange réactionnel de PCR est préparé dans un volume final de 50µl constitué de : 5µl de tampon de la réaction (10X) ; 0,4µM de chaque amorce ; 200µM de dNTP ; 3mM de MgCl₂ ; 10% diméthylsulfoxyde DMSO ; 2U de Taq polymérase, 2 µl d'ADN total et de l'eau ultra-pure. Les conditions d'amplifications figurent dans le (tableau 8).

III.4.3. Dépistage du gène *aac (6')-Ib*

La recherche du gène *aac (6')-Ib* a été réalisée sur toutes les souches, en utilisant des amorces permettant d'amplifier tous les variants décrits :

aac (6')-Ib (sens) (5' ATGACTGAGCATGACCTTG 3') ;

aac (6')-Ib (antisens) (5' AACCATGTACACGGCTGG3') ;

qui génère un fragment de 476pb.

La souche de référence qui a servi de contrôle positif est : *E. coli* U2A1528.

La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur (Perkin Elmer Gene) dans un volume réactionnel de 50µL contenant 2µL de l'ADN des souches; 0,4µM de chaque amorce; 100 µM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP); 2U de Taq DNA polymérase (Pomega, Madison ,USA); 2,5 mM de MgCl₂ et 5 µl tampon 10 X de PCR (Promega, Madison,USA) . Les conditions d'amplifications figurent dans le (tableau8).

Tableau8 : Programmes d'amplifications des gènes de résistance plasmidiques aux quinolones

| type de gene | Etape initiale | Dénaturation/hybridation/élongation | Nombre de cycles | Etape finale/Elongation |
|--------------|----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------|
| aac(6')-Ib | 94°C 5 min | 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1 min | 30 | 72°C 7 min |
| qepA | 94°C 4min | 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1 min30s | 30 | 72°C 7 min |
| qnr(A,B,S) | 94°C 5 min | 94°C 1min,60°C 45s, 72°C 1 min | 30 | 72°C 10 min |

III.4.4. Identification de *aac (6')-Ib* :

L'identification du variant *aac (6')-Ib-cr* à été faite par le criblage des gènes *aac (6')-Ib* par la technique de polymorphisme de fragment de restriction ; RFLP (Restriction fragment length polymorphism).

La technique de RFLP est le résultat de la combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à nombre élevée de sites de coupure et d'une électrophorèse simple.

L'enzyme de restriction utilisé pour l'identification du variant *aac (6')-Ib-cr* dans notre étude, est l'enzyme FokI (Fermentas), qui a un site de reconnaissance présent seulement dans le gène *aac (6')-Ib* type sauvage (le variant *aac (6')-Ib-cr* n'a pas ce site de reconnaissance). Les produits de PCR positifs contenant le gène *aac (6')-Ib* sont coupés en deux fragments de taille 224pb et 189pb.



Figure6 : La séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction FokI

La réaction de la digestion enzymatique a été faite à 37°C pendant 3 heures dans un volume final de 16µl constitué de : 1U de l'enzyme FokI ; 8µL de produit du PCR et l'eau ultra-pure.. La



révélation des produits de la digestion enzymatique a été faite grâce à la migration électrophorétique sur gel d'agarose de 1,8% et sous un voltage de 80V pendant une heure.

III.5. Détermination des intégrons classe 1

Cette technique est utilisée afin de savoir si la souche étudiée possède une cassette de gènes d'Intégrons de classe 1 et d'en connaître la taille. Les intégrons classe I sont constitués d'une région 5' bien conservée comprenant un gène *intI* (qui code pour une intégrase), un promoteur et un site d'attachement *attI*; et d'une région 3' qui diffère selon les intégrons. Il s'agit donc d'une PCR classique dont les amorces sont spécifiques de zones caractérisant tous les intégrons.

Les primers CS-3' [AAGCAGACTTGACCTGA] et CS-5' [GGCATCCAAGCACAGCAAG] viennent s'hybrider avec des séquences conservées spécifiques de l'Intégron de classe 1.

Toutes les amplifications ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant : 2,5 µl d'ADN total, 50 pmole pour chaque primer; 1,75 U de Taq polymérase; 10% de tampon 10X; 2mM des MgCl₂; 10% DMSO et compléter par l'eau biologie moléculaire. L'ADN a été amplifié selon le programme: une dénaturation 10 minutes à 94°C avec 30 cycles [dénaturation 30 secondes à 94°C, hybridation 30 secondes à 55°C, une élongation de 72°C pendant 2 minutes] et une extension finale de 72°C pendant 10 minutes

III.6. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, L'ARN ou les protéines en fonction de leur taille. La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose: les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Les électrophorèses ont été réalisées sur gel d'agarose de 0,8 à 1,5 % en fonction de la taille du fragment d'ADN et sous une tension constante de 80 à 100 mV. Le tampon de migration utilisé a été le Tris-Borate- EDTA 0.5X (TBE 0,5 x).



L'estimation de la taille des fragments est faite grâce à la comparaison avec l'échelle de marqueur de taille moléculaire (le marqueur phage λ digérer par l'enzyme *EcoRI* et *Hind III* ou 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Vinius, Lithuma).

La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au bromure d'éthidium ou BET (0.4-0,5 mg/ml). Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

III.7. Etude de transfert des gènes de résistance / conjugaison.

Cette technique consiste à transférer un plasmide conjugatif portant la résistance codant pour une BLSE d'une souche donatrice vers une souche réceptrice *E. coli* K12J5 (résistante à l'azide de sodium) ou *E. coli* C600 (résistante à l'acide nalidixique).

Ce transfert des gènes par conjugaison a été réalisé par la méthode en milieu liquide utilisant comme milieu de culture le bouillon Luria-Bertani (LB) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). La souche réceptrice, doit posséder un caractère de résistance chromosomique vis-à-vis d'un antibiotique auquel la souche donatrice est sensible (ici azide de sodium afin de sélectionner les transconjugants (bactérie réceptrice ayant acquis le plasmide de résistance) tout en éliminant les bactéries donatrices et les bactéries réceptrices n'ayant pas acquis le plasmide de la bactérie donatrice, la culture après l'étape de conjugaison s'effectue en présence de deux antibiotiques: l'un correspond à une des résistances transférées (portées par le plasmide), l'autre correspond à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

Cette expérience se déroule sur cinq jours, le transfert des gènes de résistance par conjugaison a été réalisé par la méthode en milieu liquide de culture le bouillon Luria-Bertani (LB) (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette-France). A partir de la gélose Mc Conkey (Bio-Rad Marnes-La-Coquette-France), des colonies pures de 18 à 20 heures des souches réceptrices et donatrices ont été prélevées etensemencées sur le bouillon coeur cerveau fraîchement préparé suivant les recommandations du fabricant. Cinq millilitres du milieu LB ont étéensemencés pour la souche donatrice et pour la souche réceptrice.



Les bouillons ainsi ensemencés ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'incubation des souches réceptrices a été faite sous agitation. Dans un erlenmeyer de 50 ml stérile, on mélange les cultures en phase exponentielle des souches donatrices (1 ml) et réceptrice (1ml) à l'aide d'un vortex. Après avoir ajouté 1 ml du milieu LB stérile, les cultures sont incubées pendant 3 heures à 37°C.

Une série de dilution avec l'eau physiologique (Na Cl, 0,9%) de 10⁻¹ à 10⁻⁶ est ensemencée sur gélose LB agar contenant le CTX (2 µg/mL) et 200µg/mL d'azide de sodium

pour sélectionner les transconjugants de la souche *E. coli* K₁₂J₅ et 2 µg/mL de CTX + 25µg/mL de l'acide nalidixique pour sélectionner les transconjugants de la souche *E. coli* C600.

Des dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ ont été aussi ensemencées à raison de 0,1 ml par dilution sur une gélose Mc Conkey dépourvu d'antibiotiques pour le contrôle. Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. Vingt quatre heures après incubation les boîtes ont été examinées et les colonies dénombrées.

Les transconjugants obtenus ont été identifié et soumis à l'antibiogramme, test de double synergie, criblage des gènes codant pour les BLSE et d'autres gènes de résistance associés.

III.8. Extractions des plasmides

Après avoir confirmé la transmission de la résistance chez les transconjugants on vérifie le transfert de plasmide qui porte la résistance aux beta-lactamines :

L'extraction des plasmides bactériens chez les souches donatrices et transconjugants est réalisée selon la technique de Kado et liu . Cette technique est basée sur une extraction d'ADN plasmidique en utilisant des solutions alcalines décrites par la méthode modifiée de [63]. Une électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour la révélation des plasmides après coloration au bromure d'éthidium (BET).

Protocole de kado et liu : A partir, d'une culture fraîche de bactérie sur gélose TCS, on prélève à l'aide d'une anse quelques colonies de bactéries qu'on met en suspension dans 50µl de la solution S1 (50 mM Tris et 1 mM EDTA pH 8). On ajoute 100 µl de la solution S2 (50 mM Tris, 3 % SDS et 0,4 N de NaOH, pH: 12,5) puis on incube 30 à 40 minutes dans un bain-marie à 56°C. Après incubation on ajoute 100 µl du phénol / chloroforme non saturé (25:24) qu'on vortex vivement



pendant 10 secondes et on centrifuge à 12000 rpm pendant 20 minutes. On récupère 80µl du surnageant et on ajoute 10µl de la solution Loading buffer x10 . On dépose 25 à 30µl dans un gel de 0.75% d'agarose sous un voltage de 90V pendant 3 heures. On colore 15 minutes dans une solution au bromure d'éthidium 0.4 µg/ml et on visualise sous UV qu'on photographie avec un appareil de prise de photo sous UV" Gel doc».

III.9. Typage moléculaire des *Entérobactéries* productrices de BLSE : ERIC/REP-PCR

Dans les techniques d'amplification aléatoire, (la) ou (les) amorces ne sont pas spécifiques d'un germe ni d'un gène, c'est l'une des techniques employées en épidémiologie.

Cette technique consiste à amplifier une partie du génome, grâce à une polymérase et des amorces encadrant la région à amplifier. Le résultat de l'amplification est la production d'un amplicon en quantité telle qu'il est macroscopiquement visible [64].

Le typage moléculaire des souches productrice de BLSE à été réalisé par la méthode Enterobacterial Repetitive Consensus (ERIC-PCR) et la méthode Repetitive Extragenic Palindromic (REP-PCR). Ces techniques utilisent des séquences répétitives conservées présentes chez les entérobactéries et de nombreuses autres espèces bactériennes. Par l'amplification de séquences entre les éléments Repetitive Extragenic Palindromic (REP) ou Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) [65], ces méthodes permettent de rendre compte de la variabilité de l'ensemble du génome bactérien [60] d'analyser le génome des bactéries appartenant à des groupes phylogénétiquement proches et de rendre compte de la dispersion des séquences inter-ERIC et REP caractéristiques de chaque souche bactérienne [65].

Pour la méthode ERIC-PCR on utilise deux amorces ERIC-1 et ERIC-2 et pour la méthode REP-PCR on utilise l'amorce Rep2 dans des réactions d'amplifications séparées (PCR-simplexe).

Tableau9 : Les amorces d'ERIC-PCR et REP-PCR utilisées

| Technique | Amorce | Séquence |
|-----------|--------|------------------------------|
| ERIC-PCR | ERIC-2 | 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3' |
| REP-PCR | REP-2 | 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' |



Technique :

- Le mélange réactionnel de 25µl pour chaque méthode (ERIC-1, ERIC-2 et REP-2) est constitué de 5µl de l'ADN total des souches ; 0,8µM de l'amorce ; 10% DMSO ; 0,17mg BSA ; 0,2mM de dNTP ; 1,5mM MgCl₂ ; 2U de Taq DNA polymérase (Promega, Madison, USA) et 2,5 µL 10X tampon PCR.
- Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95°C pendant 7 min, suivi de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min, 65°C pendant 8 min, et enfin un cycle à 65°C pendant 16 min.
- Pour la révélation des produits de ces réactions : 10µl de chaque produit d'amplification ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5 %.
- Les échantillons migre

Les entérobactéries constituent les agents étiologiques les plus fréquemment décrits dans les infections communautaires. Les espèces de cette famille, ont été depuis une vingtaine d'années largement exposées à une utilisation extensive des antibiotiques [1].

Le principal problème lié à l'utilisation de ces antibiotiques est l'émergence puis la montée de la résistance acquise chez les bactéries responsables d'infections humaines. Le phénomène est planétaire et constitue un sérieux problème pour la santé publique, et de ce fait un sujet de beaucoup de travaux de recherche.

Notre étude prospective et analytique portant sur des bactéries isolées dans un laboratoire privé des analyses médicales de la ville de TAZA chez des patients atteints des infections communautaires sur une période de quatre mois.

I. Etude clinique

l'identité de la souche ainsi que les antibiogrammes étaient fournis par le laboratoire.

L'étude a concerné des patients (n=84) de différentes catégories d'âge définie comme suit :

Nouveau-nés et nourrissons : âge inférieur à 2 ans ;

Enfants : âge compris entre 2 ans et 12 ans ;

Adultes : âge supérieur à 13 ans.

I.1. La nature des infections communautaire causées par les entérobactéries étudiées

Au sein de la population des personnes infectées (n=84), trois types d'infections ont été trouvées : les infections urinaires (n=77 ; 87,5%), les infections vaginales (n=6 ; 6,8%) et une infection pulmonaire. (n=1 ; 1,13%).

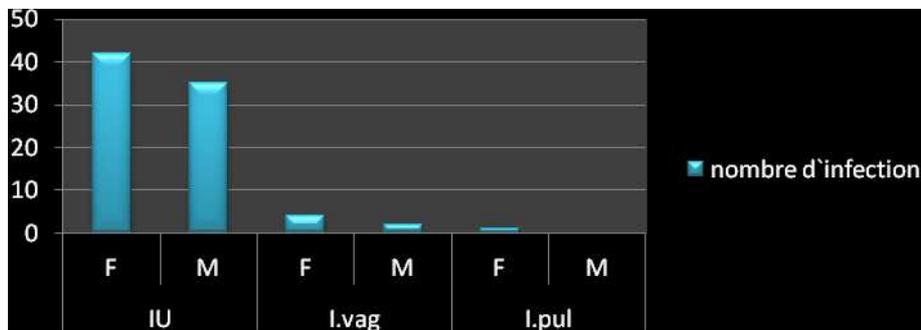


Figure 7 : la nature des infections communautaire chez les deux sexes

IU : Infection urinaire ; I. vag : infection vaginale ; I.pul : infection pulmonaire

F : Féminin; M : masculin

I.2. Répartition des patients en fonction de l'âge et du sexe :

La répartition des infections n'est pas identique chez les deux sexes ; on note 46 (54,76%) infections chez le sexe féminin, contre 38 (45,24%) infections chez le sexe masculin (sexe ratio F/M= 1,27). Cette fréquence féminine est notée aussi chez les enfants or, sur les 11 nouveau-nés concernés par l'étude, 7 sont de sexe féminin.

Indépendamment du sexe, la catégorie d'âge la plus affectée est celle des adultes avec un pourcentage de 83,33% dont 44,04% pour le sexe féminin.

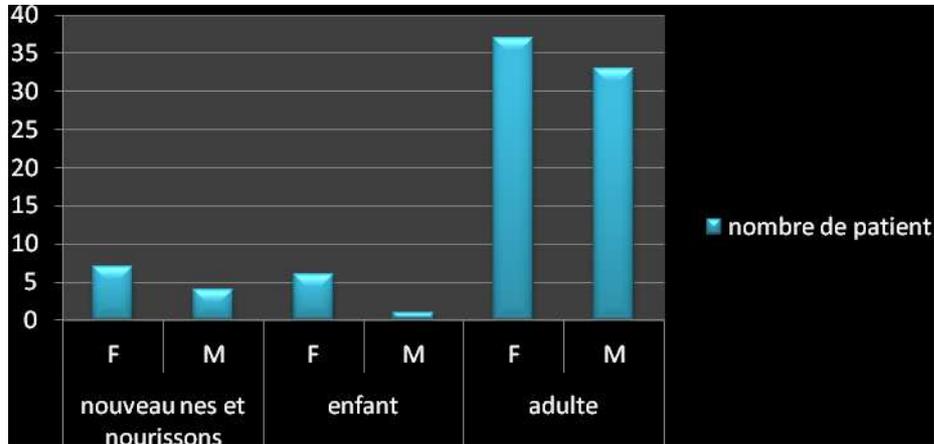


Figure 8 : Répartition des patients en fonction de l'âge et du sexe

F : féminin ; M : masculin

I.3. Répartition des souches bactériennes en fonction des espèces

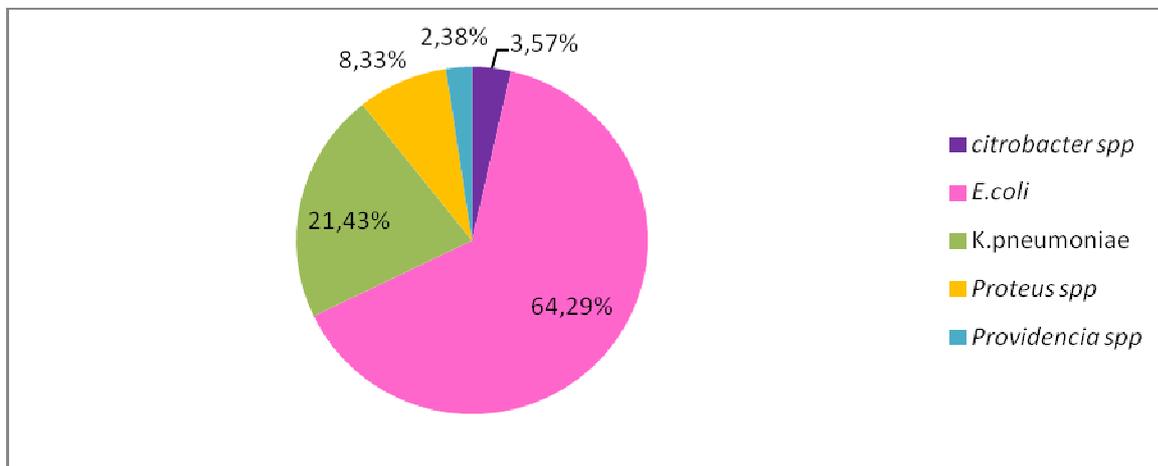


Figure 9 : Répartition des souches en fonction de l'espèce

Dans la collection des 84 souches d'entérobactéries recueillies, les genres Escherichia, Klebsiella, Proteus, Providencia et Citrobacter ont été distingués.

L'espèce E.coli est la plus fréquente avec un pourcentage de 64,29%, suivie de K. pneumoniae (21,43%) , Proteus spp (8%) , Citrobacter spp (4%) puis Providencia spp (2%).

I.4. Répartition des espèces en fonction du sexe et de l'âge des patients

L'espèce E. coli est présente chez toutes les classes d'âges des deux sexes, avec une fréquence nettement plus élevée par rapport aux autres espèces. La majorité des souches d'E.coli (64,29%) sont isolées chez des patients adultes.

Tableau10 : Répartition des espèces en fonction du sexe et de l'âge des patients

| Espèce | | Nouveau- nés et nourrissons | | Enfants | | Adultes | | Total | |
|-------------------------|---|-----------------------------|---|---------|---|---------|----|-------|----|
| | | F | M | F | M | F | M | F | M |
| | | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 4 | 1 | 28 | 19 | 33 |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 0 | 1 | 2 | 1 | 4 | 10 | 6 | 12 | |
| <i>Providencia spp.</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | |
| <i>Proteus spp.</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 4 | 3 | |
| <i>Citrobacter spp.</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | |

Klebsiella spp, occupe la deuxième position après Escherichia coli. Bien qu'elle soit isolée chez toutes les catégories d'âge, elle prédomine chez les adultes de sexe masculin. Ni Citrobacter spp., ni providencia spp, n'étaient trouvées chez les enfants.

II. Profil de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques

L'analyse du degré de résistance globale aux différents antibiotiques montre que la totalité (n=84) des entérobactéries étudiées sont résistantes à au moins un seul antibiotique.

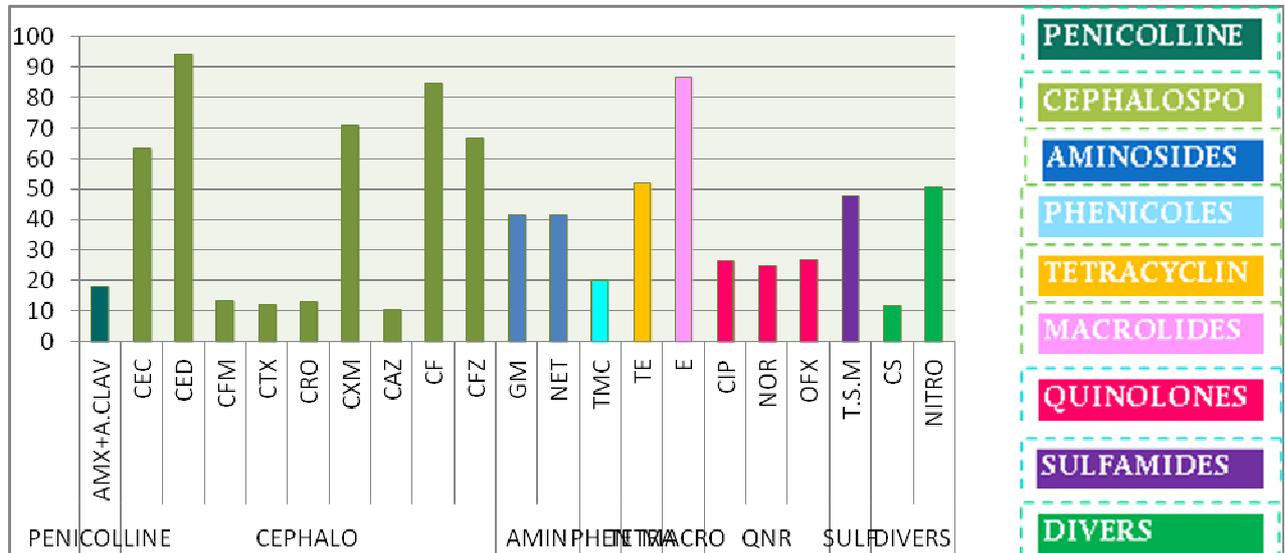


Figure 10: Fréquences de la résistance des entérobactéries étudiés vis-à vis différents antibiotiques

Indépendamment de l'espèce les niveaux les plus élevés de la résistance chez les entérobactéries étudiées, ont été observés pour erythromycine (84,52%), Cefadroxil (94,29%), cefalotine(84,48%), Cefuroxime(71,05%), Cefaclor(63,49%) et Cefazoline (66,67%)

L'analyse de la fréquence de résistance en fonction de la famille d'antibiotique montre que la famille des MACROLIDES est la plus touchée (86,59%) suivie de TETRACYCLINE(51,85%), CEPHALOSPORINE(47,71%), SULFAMIDES(47,62%), AMINOSIDES(41,67%), QUINOLONES(25,97%), PHENICOLES(20,24%) et la famille des penicolline(18,07%).

Une faible résistance a été observée pour les céphalosporines de troisième génération(CFM(13,51%),CTX(12,28%),CRO(13,16%),CAZ(10,53%) ainsi qu'une sensibilité vis avis de Cs(11,59%).

III. Prévalence des entérobactéries productrices de BLSE et céphalosporinase plasmidique de type AmpC

La recherche des entérobactéries productrices de BLSE et/ou AmpC a été effectuée que chez les entérobactéries résistantes aux C3G. Par le test de synergie et double diffusion, dix souches sont trouvées productrices de BLSE et une souches productrice de céphalosporinase de type AmpC :

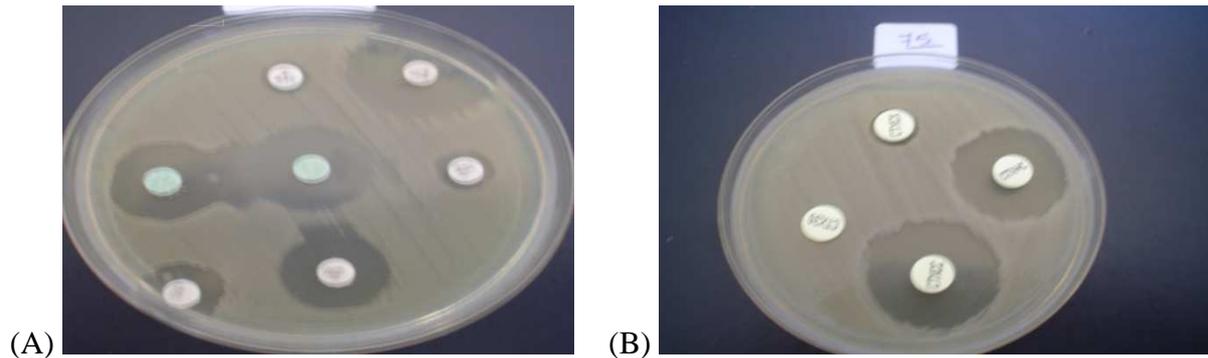


Figure 11 : Exemple d'une souche productrice de BLSE détectée par le test de synergie (A) et double diffusion (B)

L'analyse du profil de résistance aux antibiotiques des souches étudiées montre que les entérobactéries productrices de BLSE présentent une résistance à au moins 6 antibiotiques et que la totalité des souches étudiées étaient sensibles à l'imipénème.

L'étude de la co-résistance avec les autres familles d'antibiotiques que les β -lactamines montre que ces souches sont multi-résistantes aux antibiotiques avec les fréquences de résistance les plus élevés sont obtenus pour la tétracycline suivie de kanamycine, acide nalidixique, ciprofloxacine, tremithoprime, gentamicine, tobramycine et cotrimoxazole

Tableau11 : Résultats des données des différentes souches productrices de BLSE

| souche | espèces | Date d'isolement | Sexe/âge | Origine di infection | Résistance |
|--------|----------------|------------------|----------|----------------------|---|
| 6 | <i>Proteus</i> | 07/09/2011 | M/69 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ- SAM- CIP-NA-TMP-SXT -GM-K-TOB-TE |
| 18 | <i>Proteus</i> | 22/09/2011 | M/51 | IU | CFM-CRO-CAZ SAM-CIP-TMP-SXT -GM-K-TOB-TE |
| 36 | <i>E. coli</i> | 08/10/2011 | M/69 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-TMP-SXT GM-K-TOB-TE |
| 54 | <i>E.coli</i> | 17/11/2011 | F/71 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-SXT -K-TOB-TE-ETP |
| 47 | <i>E.coli</i> | 24/11/2011 | F/34 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-NA-TMP-SXT K-TOB-TE-ETP |



| | | | | | |
|----|-------------------|------------|------|----|--|
| 55 | <i>klebsiella</i> | 24/11/2011 | M/81 | IU | TCC-CFM-CAZ-SAM-K-TE |
| 61 | <i>klebsiella</i> | 29/11/2011 | M/45 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-TMP-SXT GM-K-TOB-TE-ETP |
| 68 | <i>E.coli</i> | 29/11/2011 | F/28 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-TMP-SXT -GM-K-TOB-TE |
| 75 | <i>E.coli</i> | 06/12/2011 | M/61 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-NA-TMP-SXT GM-K-TOB-TE-ETP |
| 72 | <i>E.coli</i> | 09/12/2011 | F/71 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-NA-TMP-SXT GM-TE-ETP |
| 62 | <i>E.coli</i> | 07/12/2011 | M/61 | IU | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-SAM-CIP-NA-TMP-SXT GM-K-TOB-TE-ETP |

IV. Etude génotypique

Le contenu en β -lactamases, déterminant de la résistance plasmidiques aux quinolones, intégron classe I et le typage moléculaire ont été réalisés pour les entérobactéries résistantes aux C3G.

IV.1. Typage moléculaire des BLSE produites

Le tableau.12 rapporte la répartition des différentes BLSE identifiées chez les souches étudiées. Parmi les 10 souches d'entérobactéries productrice de BLSE étudiées, 9/10 (90%) sont productrices de BLSE de type CTX-M groupe1, 7/10 (70%) des souches sont productrices de β -lactamase de type OXA-1, 4/10(40%) de TEM et 3/10 (30%) de SHV. Huit souches exprimaient au moins deux types de bêta-lactamase, dont la coexistence CTX-M+OXA-1 (4/10) était fréquente suivi de l'association CTX-M+SHV+TEM+OXA-1 (2/10).

IV.2. Typage moléculaire des AmpC produites

Le test de double diffusion montre que la souche *K. pneumoniae* portant le code 55 est phénotypiquement productrice de céphalosporinase de type AmpC. Les résultats de la recherche des céphalosporinases plasmidique de type AmpC par la technique de PCR multiplexe montre que cette souche est productrice de céphalosporinase de type *bla_{CTT}*.

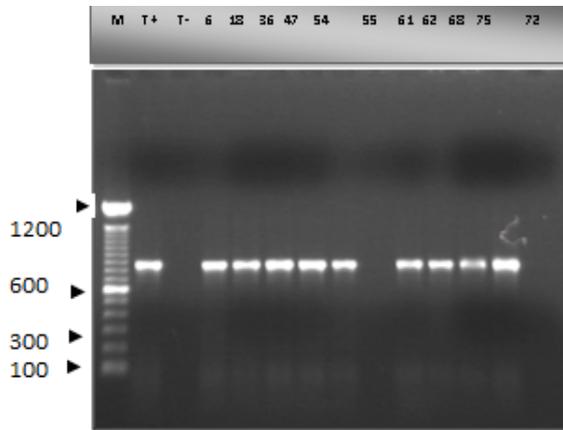


Figure 12 : Profil de la PCR du gène CTX-M1

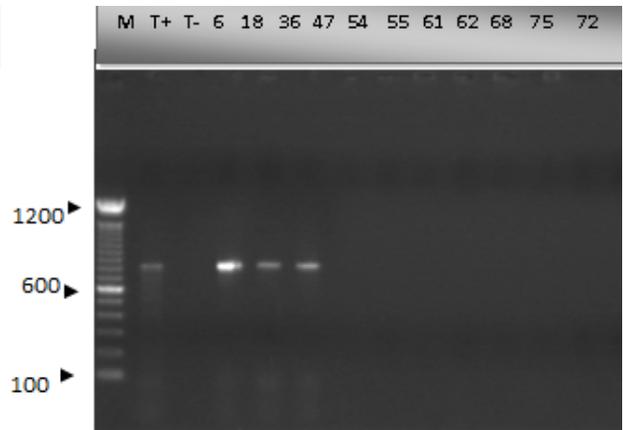


Figure 13 : SHV PCR (795bp)

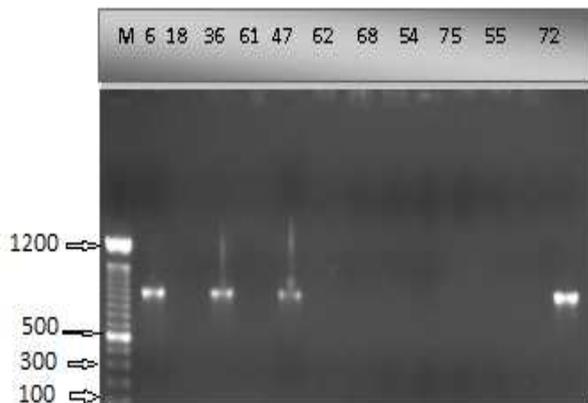


Figure 14 : Profil de la PCR du gène TEM



Figure 15: Profil de la PCR du gène OXA

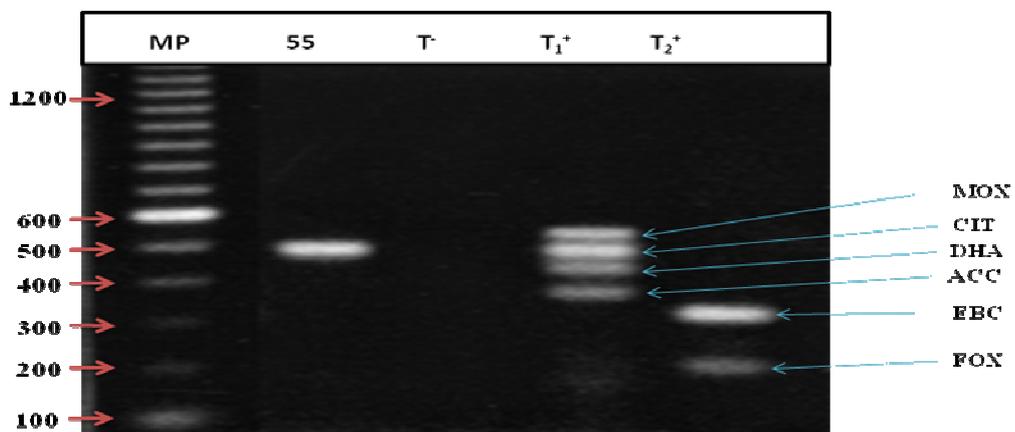


Figure 16 : Profil de la PCR du gène AmpC

Tableau12 : Résume les résultats de PCR obtenus pour les 11 souches étudiés

| Code de la souche | Espèce | OXA-1 | CTX-M 1 | SHV | TEM | AmpC |
|-------------------|----------------------|-------|---------|-----|-----|---------|
| 6 | <i>Proteus.spp</i> | + | + | + | + | - |
| 18 | <i>Proteus. spp</i> | - | + | + | - | - |
| 36 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | - |
| 47 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | - |
| 54 | <i>E.coli</i> | - | + | - | - | - |
| 55 | <i>K. pneumoniae</i> | - | - | - | - | + (CIT) |
| 61 | <i>K. pneumoniae</i> | + | + | - | - | - |
| 62 | <i>E.coli</i> | + | + | - | - | - |
| 68 | <i>E.coli</i> | + | + | - | - | - |
| 75 | <i>E.coli</i> | + | + | - | - | - |
| 72 | <i>E.coli</i> | - | - | - | + | - |

IV.2.1. Résultats de PCR des gènes de résistance plasmidique aux quinolones

La résistance aux quinolones fait intervenir différents mécanismes. Les mécanismes les plus fréquents et les mieux connus sont la modification des cibles (topoisomérases de type II) et ceux liés à un défaut d'accumulation dans la bactérie, soit par une diminution de la pénétration de la paroi, soit par un efflux important de quinolones. Récemment, trois mécanismes de résistance plasmidique ont été décrits : protection des cibles des quinolones par les protéines QNR, hydrolyse des quinolones par une protéine dérivée d'une enzyme responsable de la résistance aux aminosides (AAC(6')-Ib-cr) et efflux par une protéine membranaire (QepA).

IV.2.1.a. Recherche des gènes *qnr*

La recherche de souches porteuses des gènes *qnr* parmi les souches étudiées (n=11) montre que trois souches (3 / 11) sont *qnr B* positives : 2 *K. pneumoniae* et une *E. coli* . Les gènes *qnr A* et *qnr B* n'ont pas été détectés.



Figure 17: détection du gène *qnr* (A, B et S) par PCR multiplex

M : Marqueur de Poids moléculaire :100pb laeder, T- : Témoin négatif

QnrA ,qnrB ,et qnrS : Témoins positifs

IV.2.1.b. Recherche du gène *qep A*

Toutes les 11 souches étudiées sont négatives ; ne portent pas le gène *qepA*.

IV.2.1.c. Résultats de PCR du gène *aac(6')-Ib*

La recherche du gène *aac(6')-Ib* chez les 11 souches d'entérobactéries étudiées montre que 8 souches sont porteuses du gène *aac(6')-Ib* (72,72 %). L'identification du variant *aac(6')-Ib-cr* par la technique de PCR-RFLP a montrée que 7 souches porteuses de cette variant.

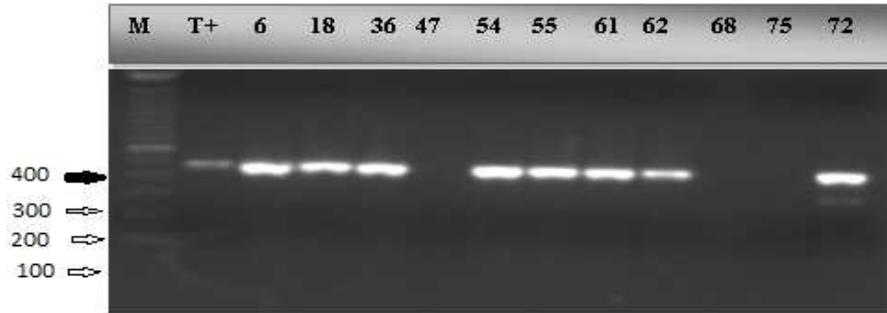


Figure18 :Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification par PCR pour le gène *aac(6)-Ib*

M : marqueur de poids moléculaire : 100pb laede

T+ : Témoin positif

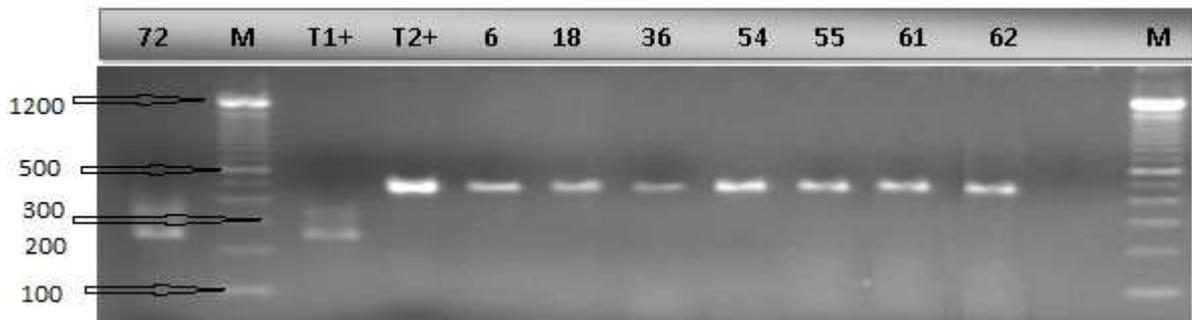


Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de digestion enzymatique

(RFLP) pour la détection des variants *aac(6)-Ib-cr* et *aac(6)-Ib*

T1+ : *aac(6)-Ib*

T2+ : *aac(6)-Ib-cr*

M : marqueur de poids moléculaire : 100pb ladder

Les souches 6 ; 18 ; 36 ; 54 ; 55 ; 61 ; 62 sont des *aac(6)-Ib-cr*

La souche 72 présente le variant *aac(6)-Ib*

Tableau13 : Résume les résultats de PCR des gènes de résistance coexistant avec les blse

| code de la souche | qnr | | | aac (6')-Ib | qepA |
|-------------------|------|------|------|-------------|------|
| | qnrA | qnrB | qnrS | | |
| 6 | - | + | - | + | - |
| 18 | - | + | - | + | - |
| 36 | - | + | - | + | - |
| 47 | - | - | - | - | - |
| 54 | - | - | - | + | - |
| 55 | - | - | - | + | - |
| 61 | - | - | - | + | - |
| 62 | - | - | - | + | - |
| 68 | - | - | - | - | - |
| 75 | - | - | - | - | - |
| 72 | - | - | - | + | - |

IV.2.2. l'intégron de classe 1 (*intI*)

Parmi les 11 souches étudiées, 6 entérobactéries productrices de BLSE possèdent des intégrons de classe 1 (54,54%) avec une souche qui possède 2 types d'intégrons de classe 1 (Tableau14).

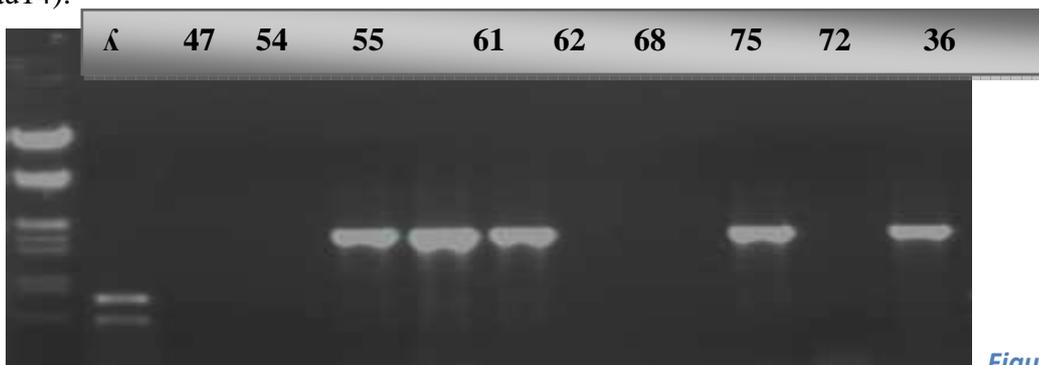


Figure20 :profil

électrophorétique de l'intégron classe 1

Tableau 14: Résultats de la détection de l'intégron 1

| code de la souche | Espèce | Taille d` integron1 |
|-------------------|----------------------|---------------------|
| 6 | <i>Proteus.spp</i> | 1,6kb |
| 18 | <i>Proteus spp</i> | 1,6kb |
| 36 | <i>E. coli</i> | 1,6kb |
| 47 | <i>E. coli</i> | 0,5kb ; 0,7kb |
| 54 | <i>E.coli</i> | - |
| 55 | <i>K. pneumoniae</i> | - |
| 61 | <i>K. pneumoniae</i> | 1,6kb |
| 62 | <i>E.coli</i> | 1,6kb |
| 68 | <i>E.coli</i> | 1,6kb |
| 75 | <i>E.coli</i> | - |
| 72 | <i>E.coli</i> | - |

IV.2.3. Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison

Afin de déterminer la transférabilité du plasmide portant le gène CTX-M et examiner une éventuelle association des gènes de résistance aux autres antibiotiques et les BLSE des souches BLSE positives, des expériences de conjugaisons ont été réalisées en utilisant la souche d' *E.coli* K12J5 résistante à l'azide de sodium et *E. coli* C600 résistante à l'acide nalidixique comme souches réceptrice.

Après criblage des transconjugants sur milieu sélectif. Deux transconjugants Tc54 et Tc62 obtenus respectivement des isolats 54 et 62 étaient résistants à l'amoxicilline, cefexime, ceftazidime, céftriaxone, et aztréonam et montrent une diminution de sensibilité à la kanamicine, tétracycline et triméthoprime. Ceci indique un co-transfert des gènes de β -lactamases et autres gènes de résistance.

Les réactions de PCR montrent que le transconjugant Tc54 héberge le gène CTX-M. alors que le transconjugant Tc62 héberge le gène CTX-M et l'intégrons Classe 1. L'analyse du contenu plasmidique des souches hébergeant le gène CTX-M et de leurs transconjugants montre que le gène *bla_{CTM}* est porté par un même plasmide de haut poids moléculaire (125 kb).

Tableau15 : Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : BLSE, PMQR et leurs transconjugants

| Code | Espèce | |
|------|--------|--|
|------|--------|--|

| | | résistance | plasmide | BLSE | PMQR |
|-------|----------------|--|-----------------|-------------------|-----------------------------------|
| 54 | <i>E. coli</i> | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-K-TOB-TE | 125kb | CTX-M-1 | <i>aac (6')-Ib</i> |
| TC 54 | <i>E. coli</i> | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ- K -TE | 125kb | CTX-M-1 | - |
| 62 | <i>E. coli</i> | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-CIP-TMP-GM-K-NA-TOB-SXT-TE | 125kb ; 70kb | CTX-M1 / OXA-1 | <i>aac (6')-Ib/ integron1</i> |
| TC 62 | <i>E. coli</i> | TCC-CFM-CRO-ATM-CAZ-TMP-K-NA | 125kb | CTX-M1 / | <i>Integron1</i> |

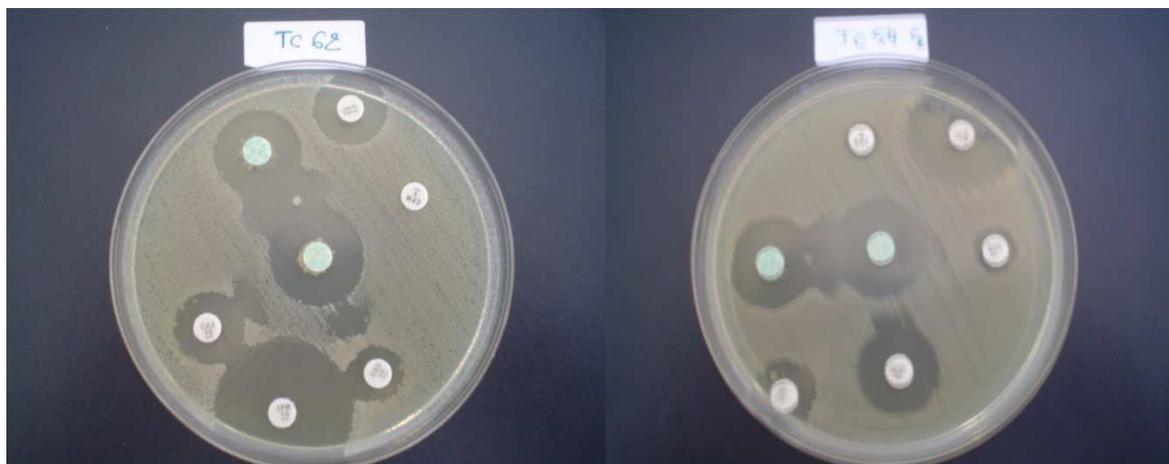


Figure 21: Détection des TC BLSE (TC 62 et TC54)

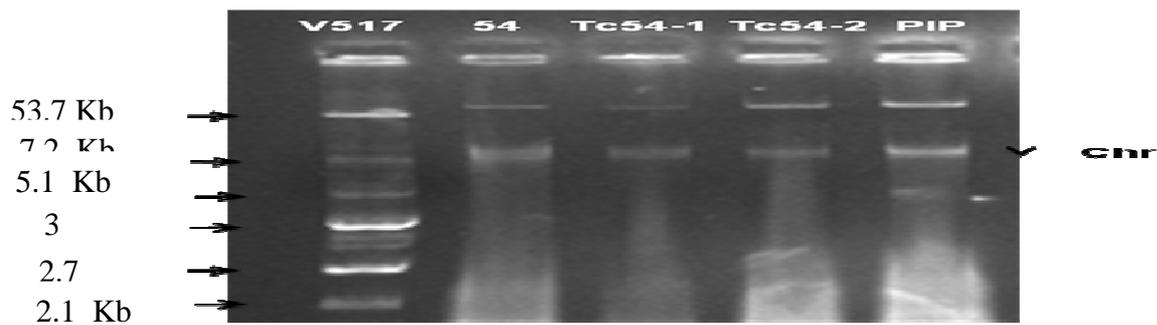


Figure 22 :Profil plasmidique de la souche d'origine (54) et leur transconjugants (Tc.54-1 et Tc54-2).

(*E. coli* V517) et (plasmide PIP 173) : témoin de poids moléculaire ;
Tc54-1,Tc54-2 son transconjugants a partir de la souche 54
Chr : chromosome Électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%

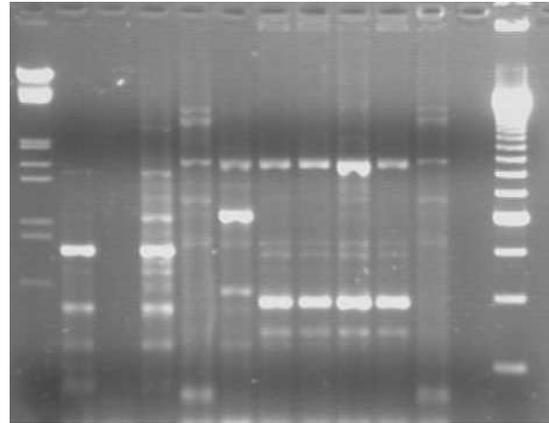
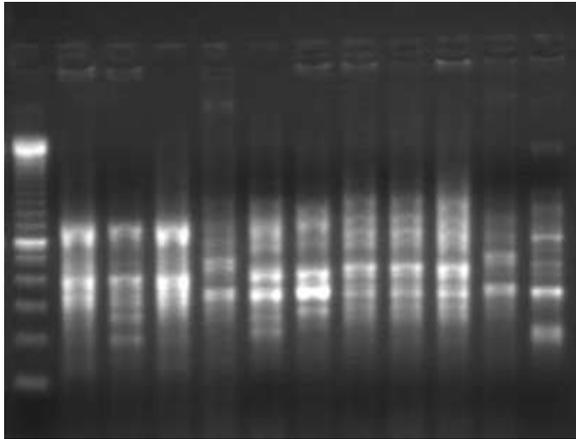


Figure 24: Résultats d'ERIC –PCR des 11 souches BLSE Figure25 : Résultats de REP-PCR

Tableau16 : Relation épidémiologique entre les 11 souches étudiées par ERIC/REP-PCR

| code | espèce | date d'isolement | sexe | âge | profil ERIC-PCR | Profil REP-PCR |
|------|--------------------|------------------|------|-----|-----------------|----------------|
| 6 | <i>Proteus spp</i> | 07/09/2011 | M | 69 | A | — |
| 18 | <i>Proteus spp</i> | 22/09/2011 | M | 51 | B | II |
| 36 | <i>E. coli</i> | 08/10/2011 | M | 69 | A | — |
| 47 | <i>E.coli</i> | 17/11/2011 | F | 71 | C | III |
| 54 | <i>E.coli</i> | 24/11/2011 | F | 34 | D | IV |
| 55 | <i>Proteus spp</i> | 24/11/2011 | M | 81 | E | V |
| 61 | <i>Proteus spp</i> | 29/11/2011 | M | 45 | F | VI |
| 62 | <i>E.coli</i> | 29/11/2011 | F | 28 | F | VI |
| 68 | <i>E.coli</i> | 06/12/2011 | M | 61 | F | VI |
| 75 | <i>E.coli</i> | 09/12/2011 | F | 71 | F | VI |
| 72 | <i>E.coli</i> | 07/12/2011 | M | 61 | G | VII |



Le typage moléculaire par ERIC/REP-PCR des 11 souches d'origine communautaire productrices de BLSE a révélé 7 profils différents. Les souches 6,36 ; 47 ; 75 ; et 61, 62,68,75 ont le même profil ce qui indique qu'il s'agit de mêmes clones représentant une forte relation épidémiologique.



Discussion



Les infections communautaires présentent un grave problème de santé public et sont dues aux entérobactéries qui constituent les agents étiologiques les plus fréquemment décrits. Il existe plusieurs types d'infections : infection pulmonaire, infection vaginale et les infections urinaires (IU) qui sont les plus répandues dans les infections communautaires.

Et dans le cadre de l'étude des infections communautaires, l'IPM a étudié la fréquence des bactéries isolées d'infections communautaires et la sensibilité aux antibiotiques des principales espèces bactériennes isolées.

Au cours de notre étude, on a trouvé 87,5% IU suivie de 6,8% des infections vaginales et finalement 1,13% des infections pulmonaires.

Notre étude confirme la prédominance des IUs, en milieu communautaire comme il a été rapporté par plusieurs auteurs [68,69,70].

IUs est une maladie qui touche préférentiellement la femme adulte. Selon notre étude la catégorie d'âge la plus affectée est celle des adultes avec un pourcentage de 83,33% dont 52,85 % pour le sexe féminin c'est comme il a été rapporté par plusieurs auteurs [68,69,70]. La prédominance féminine est notée également dans la catégorie d'âge « enfants » (85,7%) ,et aussi chez la catégorie d'âge « nouveau-nés et nourrissons »(63,7%). Toutefois, le sexe ratio (F/H) peut différer d'une étude à l'autre. Dans notre cas il est de 1,27 alors qu'il est de 2,24 dans l'étude de [71] et de 1,31 dans l'étude de [70].

La circoncision semble réduire le risque d'IU chez les garçons. La prévalence féminine élevée dans les IUs serait due à des facteurs favorisants spécifiques attribués aux causes anatomiques (brièveté de l'urètre, proximité des orifices anal et vaginal), aux mauvaises habitudes d'hygiène, à la grossesse, à l'utilisation de gel spermicide, ou encore à des facteurs gynécologiques (prolapsus utérin, prolapsus vésical et sécheresse des muqueuses) [70,71]

Dans notre étude *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment responsable d'infections urinaires avec une fréquence de 64% suivie de *K. pneumoniae* (21,43%), *Proteus spp.* (8,33%), *Citrobacter spp.* (3,57%) ,puis *Providencia spp* (2,38%). Ces résultats sont similaires à ceux décrit dans des études marocaines et européennes [69,72, 71, 70].



E.coli, *Citrobacter spp*, *K. pneumoniae*, *Providencia spp* et *Proteus spp*. sont naturellement sensibles à de nombreux antibiotiques et ont acquis des résistances à de nombreuses molécules, en particulier aux bêta-lactamines pour les espèces *E. coli*, *Proteus spp*.

et *Klebsiella spp*. En effet le pourcentage de résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées dans notre étude est plus élevé pour la famille des macrolides (84,52%) suivie de leurs résistances aux céphalosporines, tetracycline et quinolones respectivement.

Ces résistances acquises sont la conséquence de la pression de sélection due au large usage de ces antibiotiques et de leur déterminisme génétique qui fait qu'elles ont un grand pouvoir de dissémination [73,74]. Cette résistance est liée à l'émergence et à l'extension de mécanismes de résistance liés à la sécrétion de bêta-lactamases qui hydrolysent le noyau bêtalactame des molécules [72]. Ceci pourrait être expliqué par l'émergence des souches productrices de BLSE, la fréquence des souches productrices de BLSE est de 11,90%, représentée par *E.coli* (8,33%), *proteus spp* (2,38%) et *Klebsiella spp* (1,19%).

La présence de entérobactéries productrice de BLSE dans le monde animal, similaires à celles qui sont retrouvées chez l'homme, pose le problème de possibles transmissions croisées (alimentaires ou par proximité), mais aussi celui de la sélection par les antibiothérapies aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Les *E. coli* multi-résistantes d'origine animale pourraient constituer un réservoir pour les plasmides de résistance des souches colonisant l'homme et pourrait expliquer l'émergence des souches R communautaires [75,76,77].

Il semblerait que les patients de sexe masculin soient plus souvent infectés par des bactéries productrices de BLSE [78,79] Néanmoins, d'autres études n'ont pas mis en évidence de différence significative entre hommes et femmes [80,68], et une autre étude menée au Canada a conclu à un risque plus élevé pour les femmes [81]. Il est donc difficile de mettre en évidence un plus grand risque pour l'un ou l'autre des sexes.

En milieu communautaire, les BLSE occasionnent le plus fréquemment des infections des voies urinaires [82] comme le montre notre étude. Des études européennes et américaines ont rapporté que la fréquence des EBLSE isolées en milieu communautaire est en augmentation [83,84], l'utilisation excessive des antibiotiques non seulement en médecine humaine mais aussi en médecine animale en serait à l'origine.



D'ailleurs effet, une part non négligeable de la consommation des antibiotiques se fait en dehors du milieu hospitalier[85].

Pour nos souches, le taux de résistance acquise à la ciprofloxacine varie de 1,19% à 19,05% selon les espèces. Ces valeurs sont proches de celles rapportées en Tunisie (8,6 à 16,8%) [72]et en Europe (3 à 12%) [86,87]. Globalement, il ressort de cette étude, qu'il existe une variabilité de la résistance aux antibiotiques au niveau communautaire, ceci pourrait être expliqué par :

- les habitudes de prescription des antibiotiques,
- La mauvaise utilisation des antibiotiques : non respect de la posologie et de la durée du traitement, utilisation abusive et automédication,
- la facilité d'achat de ces antibiotiques en pharmacie sans ordonnance.

Le problème lié aux BLSE est surtout la présence fréquente de corésistances comme, par exemple, Lors de cette étude, on a testé 7 familles d'antibiotiques (céphalosporines, pénicillines, quinolones, sulfamides, aminosides, tétracyclines, et carbapénème) sur les 11 souches d'entérobactéries qui montrent une résistance à au moins 4 familles d'antibiotiques et que la totalité des souches étudiées étaient sensibles à l'imipénème. Ce qui rend les souches multi résistantes.

En effet les études liées à la prévalence et à la diversité des types de BLSE des entérobactéries isolées à partir d'un laboratoire d'analyse médicale de Taza , ont montré la présence du blaCTX M-1,SHV,TEM et OXA-1

La coexistence des différents bêta-lactamases dans une même bactérie peut poser un problème de diagnostic et de thérapeutique [88]. Ces associations conduisent à une cosélection des gènes de résistance et au scénario de pandémie à l'hôpital et en communauté [89]. Une des grandes caractéristiques des CTX-M est leur prépondérance en médecine communautaire. En effet, si la plupart des bactéries multi résistantes sont généralement retrouvées en milieu hospitalier, ce n'est pas le cas des CTX-M qui disséminent majoritairement chez des patients de ville. Une étude canadienne menée entre mai 2004 et avril 2006 a montré que 72% des bactéries productrices de CTX-M isolées étaient d'origine communautaire [88]. Néanmoins, ces CTX-M se retrouvent en milieu hospitalier probablement par le biais d'admission de patients venant de la ville qui sont



porteurs de bactéries productrices de CTX-M. Dans notre étude les BLSE de type CTX-M sont majoritaires ce qui rejoint les résultats rapportés dans la littérature [88].

La résistance par production de BLSE est très souvent associée à une résistance aux aminoglycosides, cotrimoxazoles et quinolones. La recherche des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez les souches étudiées montre que les souches portent au moins un gène de résistance plasmidique aux quinolones. La prévalence des gènes PMQR est variable d'une espèce à l'autre, mais *E.coli* et *Klebsiella spp.* restent les plus représentées, comme souligné d'autres études [90,91,92].

La fréquence des gènes qnr chez les entérobactéries productrices de BLSE est de 27,27%. Cette fréquence est comparable à celle rapportée au RU (30%) [93] en Algérie (33,4%) [94] et en Côte d'Ivoire (27,2%). Une fréquence moins importante est observée en France (0,7%) [95] en Espagne (4,9%) [96] et en Chine (8%) [90]. La prévalence de gène aac (6')-Ib est de 72,72 %, dont 63,64% concerne le variant aac (6')-Ib-cr . Cette prévalence reste beaucoup plus élevée par rapport à celle trouvées en Corée (2,16%) [97] et en Chine (3,7%) ,ainsi qu'à celle rapportée par [98] (18,3%), et (93) (31%). La prévalence chez les EBLSE (72,72%) est nettement plus élevée que celle rapportées dans la littérature. Aucune souche porte le gène qepA ce qui est trouvé souvent dans les études, La prévalence du gène qepA à l'échelle mondiale, est faible au niveau clinique et varie entre 0,3% et 0,8% [57,98]. Ce gène à été détecté en Belgique, Japan, France, Corée, Canada, RU et Bresil (93). Le gènes aac(6')-Ib-cr reste le plus fréquent chez les EBLSE. Ceci est dû au mécanisme de diffusion de ce gène et son environnement génétique. En effet, la plupart des études moléculaires montre que ce gène est flanqué entre 2 transposons IS26 , ce qui explique sa diffusion large. L'association des gènes est plus élevée chez les EBLSE, car la majorité des plasmides portant les gènes codants pour les BLSE abritent en même temps le gène aac(6')-Ib-cr. La caractérisation moléculaire des transconjugants issus de la souche 54 et 62 et l'étude de leurs profils plasmidiques montrent que les gènes CTXM-1 et l'intégron-1 sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (125 kb).

La diffusion des CTX-M semble n'avoir épargné aucune zone géographique, quel que soit son degré d'isolement. Récemment, dans un village extrêmement isolé du Sénégal et dont la consommation antibiotique devait être nulle sinon extrêmement faible, deux enfants portaient un



clone de *E. coli* producteurs de CTX-M-15 [89] Le gène blaCTX-M-15 était situé au sein d'une région de multi résistance très similaire à celle diffusant mondialement [73,89,71].

La majorité des souches porteuses des gènes BLSE sont multirésistantes, ceci peut s'expliquer par le fait que les gènes responsables de ces résistances sont portés par le même plasmide, par la coexistence de plusieurs mécanismes de résistance ou par la production de plusieurs types enzymatiques. Les mécanismes de cette résistance ne sont pas encore clairement établis, mais certains auteurs suggèrent la cotransmission des gènes BLSE et des autres gènes de résistances par un même plasmide conjugatif [51]. Cette abondance de BLSE pourrait résulter d'une dissémination clonale et l'émergence de nouveaux clones épidémiques.

Parmi les 11 souches étudiées; et après leurs étude par ERIC et REP- PCR. 7 clones différents qui circulent dans la ville de Taza , Les souches 6, 36 ; 47 ; 75 ; et 61, 62,68,75 ont le même profil ce qui indique qu'il s'agit de mêmes clones représentant une forte relation épidémiologique. Il faut noter que la technique d'ERIC et REP-PCR ne sont pas des techniques très discriminatives pour évaluer la relation clonale entre les souches étudiées. Alors que l'étude de clonalité par des techniques très discriminatives est en projet pour une étude complémentaire. Les entérobactéries productrices de BLSE sont historiquement décrites dans les infections associées aux soins [89]. A ce titre, en raison de leur fréquence élevée, de leur potentiel pathogène, de leur caractère commensal qui expose au risque de diffusion dans la communauté, du caractère aisément transférable des mécanismes de résistance impliqués, ces bactéries multi-résistantes font l'objet d'une étude nationale de surveillance dans plusieurs villes. Ces études ont permis de constater, à l'inverse des prévisions, une diffusion des BLSE non pas de l'hôpital vers la communauté, mais l'émergence autonome de BLSE dans la communauté.

De fait, l'augmentation des entérobactéries sécrétrices de BLSE est maintenant observée partout dans le monde non seulement dans les infections hospitalières ,De plus, de nouvelles résistances émergentes, telle que la résistance aux carbapénèmes associée à différents types de carbapénémases se sont depuis ajoutées. Il est donc primordial de continuer à surveiller les bactéries multi-résistantes connues, de détecter les nouvelles bactéries multi-résistantes et d'effectuer leur signalement, ce qui place toujours le biologiste au centre de ce dispositif de veille sanitaire.



Conclusion

Dans le cadre de l'étude des infections communautaires, l'IPM a étudié la fréquence des bactéries isolées d'infections communautaires et la sensibilité aux antibiotiques des principales espèces bactériennes isolées.

Notre étude confirme la prédominance des IUs, en milieu communautaire comme il a été rapporté par plusieurs auteurs, IUs est une maladie qui touche préférentiellement la femme adulte, dont *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment responsable de ces infections suivie de *K. pneumoniae*, En effet le pourcentage de résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées dans notre étude est plus élevé pour la famille des macrolides suivie de leurs résistances aux céphalosporines, tetracycline et quinolones respectivement.

Ces résistances acquises sont la conséquence de la pression de sélection due au large usage de ces antibiotiques et de leur déterminisme génétique qui fait qu'elles ont un grand pouvoir de dissémination. Parmi les 84 entérobactéries collectées, 11,90% sont productrices de BLSE, représentée par *E.coli* (8,33%), *proteus spp* (2,38%) et *Klebsiella spp* (1,19%).

Il semblerait que les patients de sexe masculin soient plus souvent infectés par des bactéries productrices de BLSE, En milieu communautaire, les BLSE occasionnent le plus fréquemment des infections des voies urinaires.

La fréquence des EBLSE isolées en milieu communautaire est en augmentation, l'utilisation excessive des antibiotiques non seulement en médecine humaine mais aussi en médecine animale en serait à l'origine.



En effet les études liées à la prévalence et à la diversité des types de BLSE des entérobactéries isolées à partir d'un laboratoire d'analyse médicale de Taza , ont montré la présence du blaCTX M-1,SHV,TEM et OXA-1, Dans notre étude les BLSE de type CTX-M sont majoritaires

La recherche des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez les souches étudiées montre que les souches portent au moins un gène de résistance plasmidique aux quinolones. La prévalence des gènes PMQR est variable d'une espèce à l'autre, mais *E.coli* et *Klebsiella spp* restent les plus représentées.

La fréquence des gènes qnr chez les entérobactéries productrices de BLSE est de 27,27%.

La prévalence de gène aac (6')-Ib est de 72,72 %, dont 63,64% concerne le variant aac (6')-Ib-cr L'apparition de différents mécanismes de résistances à cette classe thérapeutique peuvent expliquer son importance. Ces modifications doivent nous inciter à utiliser les antibiotiques de façon raisonnée. Si l'augmentation des E-BLSE communautaires continue, nous pourrions être amenés à modifier des protocoles d'antibiothérapies probabilistes. La surveillance des E-BLSE paraît être primordiale pour l'avenir.



Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées pour compléter ce travail :

- Passer au séquençage des différents gènes amplifiés par PCR (BLSE et PMQR),
- Déterminer la clonalité des souches hébergeant les gènes BLSE et PMQR par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), et par MLST (Multi Locus Sequence Typing)
- Etude de la mobilité et du contenu plasmidique chez des transformants ou trancojugants
- Etude de l'environnement génétiques des gènes BLSE
- Elargir l'échantillonnage.

Références bibliographiques

-
- [1] CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R. Bactériologie médicale. Techniques usuelles ;SIMEP SA, Paris. (1987); 87-98 ; 121-136.



- [2] Bourjilat F., Dersi N., Bouchrif B., Amarouch H. la surveillance et la prévention des infections Nosocomiales et Communautaires au Maroc. *European Journal of Scientific Research* Vol.38 No.1 (2009), pp.57-62.
- [3] J-D.Cavallo, R Fabre, F.Jehl, C. Rapp, E. Garrabé, Beta-lactam antibiotics. *EMC-Maladies infectueuses*. (2004); I129-202.
- [4] Doit. C, Mariani-Kurkdjian. P et Bingen. E., Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. (2010) ; Volume 17, numéro S4, pages 140-144.
- [5] Bourjilat F., Dersi N., Bouchrif B., Amarouch H., Timinouni M. Profil de Résistance Aux Antibiotiques Des enterobacteries Uropathogènes Communautaires au Maroc. *European Journal of Scientific Research* Vol.38 No.1 (2009), pp.57-62
- [6] Jalier V. Nicolas M.H. Fournier G. and Philippon A. Extended-broad spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to new beta-lactam agents in enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clin. Infect. special*: (1993); 95-98.
- [7] AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H. *Bactériologie clinique*, Ellipses, Paris, 2 me édition. (2000) ; 171-177.
- [8] Ewing WH, Edwards PR., The principal divisions and groups of enterobacteriaceae and their differentiation. *Intern Bull Bacteriol Nomencl Taxon*. (1960);10: 1-12).
- [9] BERGOGNE-BEREZIN E., DELLAMONICA P. *Antibiothérapie en pratique clinique* Masson, Paris,(1999), 2 ème édition: 33-37, 48, 66-68.
- [10] CISS SBacilles à Gram négatif sécréteurs de beta-lactamases à spectre élargi : place dans les infections nosocomiales intérêt des inhibiteurs de beta-lactamases et des nouvelles molécules *Thèse Pharm.*(2001) ; Dakar, n°108.
- [11] RAPHENON G. Mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques *Forum médical*, (1996) ; 9 : 6-11
- [12] CARBON C., REGNIER B., SAIMOT G., VILDE JL., YENI P. *Médicaments anti-infectieux*. Edition Flammarion, Paris, (1994).
- [13] MEYER A., DEIANA J., LECLERC H. Les agents antimicrobiens .In : *Cours de microbiologie générale*, Doin, Paris, 1991 3 ème Ed,: 201-240



- [14] Charlier, P.,J. Coyette « résistance bactérienne aux beta-lacatmines. » médecine/sciences .(1998) ;14 :544-55.
- [16] JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M., GERARD A. De l'antibiogramme à la prescription .Biomerieux, Nancy L'étoile, 2003, 2 ème édition : 8-31
- [17] DÜRCKHEIMER W., BLUMBACH J., LATRELL R., SCHEUNEMANN KH. Recent developpement in the field of Beta-lactam antibiotics .Ang. Chem., (1985) ; 24 : 180-202.
- [18] SMEYERS Y.G., HERNANDEZ LAGUNA A., ROMERO-SANCHEZ F.J., FERNADEZ-IBANEZ M., GALEZ-RUANO E., ARIAS-PEREZ S. Journal of Pharmaceutical Sciences, (1987), 76 : 753-756
- [19] BERGOGNE-BEREZIN E., DELLAMONICA P. Antibiothérapie en pratique clinique Masson, Paris,1999, 2 ème édition: 33-37, 48, 66-68
- [20] SPILF. Antibiothérapie des infections urinaires. Deuxième conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Med Mal Inf, 21 (1991), pp. 51–54
- [21] Xian-Zhi Li, Nikaido, Hiroshi. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms, J. Antimicrob. Chemother. (2005);25; p453–63.
- [22] Ince D, Zhang X, Silver LC, (2002); Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a new des fluoroquinolone. J. Antimicrob. Chemother; 46:p3370–80.
- [23] Xian-Zhi Li. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms, J. Antimicrob. Chemother; (2005); 25; p453–63.
- [24] Li, X.-Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs.(2004); 64:p159-204.
- [25] Poole, K., Bianco N. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative, bacteria. Antimicrob. Agents Chemother.(2000);44: p2233-41.
- [26] Nordmann P, Poirel L.. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. (2006); 56: p463– 69.
- [27] Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barceló, A., Goñi, P., Giralt, E. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin- resistant clinical isolates of Escherichia coli and minimal inhibitory concentration. J. Antimicrob. Chemother .(1994); 38, p24779.



- [28] Ruiz J. Sanchez, F., Navarro, F., Mirelis, B., Jiménez de Anta, M. T.; Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, *J. Antimicrob. Chemother.*,(2003); 51, p1109-17.
- [29] Heisig, P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of highlevel fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* (1996); 40, p879–85.
- [30] Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper., *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*,(2006); 50:p1178–82.
- [31] Cavaco L. M.,Hasman H., Xia S., and arestrup F. M *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin, *J. Antimicrob. Chemother.*(2009); Feb.; p603–8.
- [32] Bradford, P.A.. Extended- spectrum betalactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin.Microbiol.*,(2001). Rev., 14:933-951.
- [33] Bouchakour M.,Pierrre-Gros-claude J.D., Zerouali K., Amarouche H., El Madaghri N.,Courvalin P., Timinouni M. (2007). High prevalence and diversity of *qnr* genes in Enterobacteriaceae, Casablanca, Morocco. 46th Inter antimicrobi and chemother. Chicago.
- [34] Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, and Champs K.D.First Report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* Recovered from Algerian Hospitals. *Dia Microb Infec.*(2008);Dis60: pp287-90.
- [35] Maurice F., Broutin I., Podglajen., Benas P., Collatz E., Frédéric D, (2007). Enzyme structural plasticity and emergence of broad spectrum antibiotic resistance, *Cristallographie & RMN Biologiques*, Université Paris Descartes.
- [36] Karah N. Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P); Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in Norwegian and Swedish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* These (BIO- 3930), (2008); Institute of Medical Biology University of Tromsø, North Norway.



- [37] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D.F, Jacoby G.A, Hooper D.C; Qnr Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates From the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.(2006);50: p2872–74
- [38] Hareley.K ,*Microbiologie perscott*. (1995); 435-439.
- [39] Madeleine Irène Miraboud, D Alain Gervais,. Genève, Entérobactéries à Béta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. thèse n° M éd .(2003) ;10303.
- [40] J.-P. Stah, épidémiologie, contrôle et traitements des résistances aux antibiotiques: compte-rendu du 45e congrès ICAAC, Washington. (2006) ;290–296.
- [41] Skurnik. D, Andrenont. A>Selecting antibiotic therapy. From theory to practice.(2006); 198-204.
- [42] Nikaido, H. outermembrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob agents chemother* .(1989);33:1831-1836.
- [43] Pitout, J. D. D,C. C.sanders, W. E. Sanders Jr.. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactames resistance in gram-negative bacilli. *Am.J. Med.* (1997);103:51-59.
- [44] Ouellette, M., and C.kundig.. microbial. Multidrug resistance.*inter.J. antimicrob. Agents*. (1997); 8:219-224.
- [45] Sanders,C .C. Beta-lactamaese of gram-negatie bacteria: New challenges for new drugs. *Clin. Infec. dis.* (1992); 14:1089-1099.
- [47] Cattoir Vincent. Les nouvelles beta-lactamases a spectre étendu (BLSE). Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Mondor, AP-HP, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII, Créteil, (2008) ;France.
- [48] Gautier. Valérie. Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes, Université P. et M. Curie ; (2007) ;Paris.
- [49] Matagne.A, Lamotte-Brasseur. J and Frère. J.M.. The catalytic properties of class A béta-lactamases : efficiency and diversity, *Biochem*, (1998); J. 330, 581-598.
- [50] Zogheib .E., Dupont. H, Entérobactéries multirésistantes. Conférences d'actualisation. 47e Congrès national d'anesthésie et de réanimation, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS(2005) pp : 153-165.



- [51] Martinez-Martinez L, Pascual A, and Jacoby G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. (1998); 351: p797–799.
- [52] A. Bauernein. I. Stemplinger. R. Jungwirt. Characterization of the plasmidic beta-lactamases CMY-2, which is responsible for cephamycine resistance. (1996); p. 221-224.
- [53] Alekshun. Michael. N et Levy. Stuart. B, *Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance*. (2007); Volume 128, Issue 6 : 1037-1050.
- [54] Zogheib .E., Dupont. H, *Entérobactéries multirésistantes. Conférences d’actualisation. 47e Congrès national d’anesthésie et de réanimation, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*. (2005) ;p : 153-165.
- [55] Vora .S et Auckenthaler. R. Que signifie « bêta-lactamases à spectre élargi » en pratique? *Rev Med Suisse*, (2009); 5:1991-1994.
- [56] Cattoir Vincent, 2008. Les nouvelles beta-lactamases a spectre étendu (BLSE). Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Mondor, AP-HP, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII, Créteil, France.
- [57] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol Infect* . (2008);14:75-81 58) .
- [58] Mammer Hedi, *Mecanismes de Resistance aux antibiotiques (DCEM1)*. Cours préparé par i, MCU-PH, Service de Bactériologie-Hygiène, CHU Amiens (2007).
- [59] Nordmann .P et Carrer. A. Les carbapénèmes des entérobactéries. Elsevier Masson SAS. *Archives de Pédiatrie*. (2010) ; 17: S154-S162.
- [60] Jalier .V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended-broad spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to new beta-lactam agents in enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility paternes. *Clin. Infect; special*. (1993); 95-98.
- [62] Arlet.G , Rouveau. M, Philippon. A, Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase.FEMS . *Microbio.Lett* .(1997);152:163-167.
- [63] Kadoc.I. LIU S.T.Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids J. *Bacterio*. (1981) ; 11365-1373.



- [64] Boulouis. H-J, Haddad. Nadia et Maillard. R.. Techniques d'étude moléculaire des isolats : principes et fiabilité. *Epidémiol et santé anim.* (2001) ;39, 21-29.
- [65] Bosi. C, Oliver. A, Ojeda. M, Pages .J.M, and Bellet. C, Most Enterobacter aerogenes stais in France Belong to a prevalent clone. *J.Clin.Microbiol*, (1999);37 (7); 2165-2169.
- [66] Versalovic. J, Koeuth.T. Lupski, J.R, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, (1991). 24: 6823-6831.
- [67] PSAST (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing),. Seventeenth Informational Supplement. (2007); M100-S17 Vol. 27 No. 1 Replaces M100-S16 Vol. 26 No. 3.
- [68] E. Calbo. Romani V.; Xercavins M, Risk factors for community-onset urinary tract infections due to E. coli harbouring extended-spectrum B-lactamases. *J Antimicrob chemother.*(2006); 57, 780-783.
- [69] EL Azhari M, Saile. R, Dersi N, Timinouni M, , Incidence des infections urinaires, et sensibilité aux bêtalactamines des principaux germes isolés. Mémoire d'études supérieures approfondies, université Hassan II- Mohammedia, faculté des sciences Ben M'SIK, Casablanca(2007)
- [70] Sekhsokh Y., Chadli M., El Hamzaoui S.A.; Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines, *Méd Mala Infect* (2008); 38 p324–327.
- [71] Larabi K, Masmoudi A, Fendri C Étude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un centre hospitalo-universitaire de Tunis: à propos de 1930 cas. *Med Mal infec*, (2003) ;33: p348–52.
- [72] Ben Abdellah H.,Sahnoun O.,Ben Roudhane F., Loussaïf C.,Noomen S., Bouzouaïa N.,Chakroun M., Mastouri M. Profil de sensibilité au antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées dans la région de monaster, *Rev Tun Infectiol* ; . (2008) ; 2 : pp5- 8.
- [73] Boukharie HA., Saeed I M. Antimicrobial resistance among pathogens causing acute uncomplicated urinary tract infection. *Infec Med* (2001); 18; 7: p358-62.
- [74] Guillemot D. Effet de l'usage des antibiotiques sur l'évolution des résistances bactériennes. *Antibiotique*, Masson, Paris (2001).; 3 : p169-72.



- [75] J. Arzouni, J.P. Bouilloux, D. de Moüy, S. Fleutiaux, J. Galinier, H. Gayon et al. Les infections urinaires chez la femme de 15 à 65 ans en pratique de ville : surveillance de la sensibilité de Escherichia coli à la fosfomycine trométamol en fonction des antécédents Med Mal Infect, 30 (11) (2000); pp. 699–702
- [76] F.W. Goldstein, Multicentre Study Group Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 19 (2) (2000), pp. 112–117.
- [77] M. Chomar Resistance of bacteria in urinary tract infections Int J Antimicrob Agents, 16 (4) (2000), pp. 483–487.
- [78] V.Gupta, P.Datta. Extended-Spectrum beta-lactamases (ESBL) in community isolates from North India: frequency and predisposing factors.Int J Infect Dis,(2007) 11, 88-89
- [79] Colodner R.,W.Rock, B.Chanzan,N.Keller,N.Guy,W.Sakran,R.Raz. Risk factors for the development of extended- spectrium beta-lactamase- producing bacteria in nonhospitalized patients. Eur J Clin Microbial Infect Dis(2004) ;23,263-267.
- [80] Moor C.T, Roberts SA, Simmons G, Briggs S, Morris AJ, Smith J,, Extended-spectrum B-lactamase(ESBL)-producing enterobacteria : factors associated with infection in the community setting Auckland,New Zeland.J Hosp Infect(2008); 68,355-362.
- [81] Laupland K.B, Henrik C , Schønheyder, Karina J, Kennedy. Community-onset extended-spectrum B-lactamase(ESBL) producing E.coli: Importance of international travel.J Infect(2008).
- [82] Revue Médicale Suisse Revue Médicale Suisse N° 220 publiée le 07/10/2009 Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique ?
- [83] Mathai D, Jones RN, Paller RA. Epidemiology and frequency of resistance among pathogenes causing urinary tract infections in 1.510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). Diag Microbiol Infect Dis; (2001); 40 : p129-36.
- [84] Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of Extended Spectrum β -lactamases and ESBL- producing microorganisms. Clin Microbiol infect. (2001); 11: p597–608.
- [85] Makaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S., Hammami A.



Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005), *Méd Mal Infect*, (2008);38 : p293-298.

[86] Prère MF, Licznar P, Decramer S, Fayet O. *Escherichia coli* des infections urinaires et pyélonéphrites aiguës en pédiatrie. *Pathol Biol* .(2004).; 52 : 497-500.

[87] Lemort ML, Neuville S, Medus M, Gueudet P, Saada M, Aumaître H Evolution comparée de la sensibilité de souches de *Escherichia coli* isolées d'infections urinaires de patients consultant aux urgences et de patients hospitalisés en 2002 et 2004 à l'hôpital de Perpignan. *Pathol Biol* .(2006); 54 : p427-30.

[88] Madec JY, Lazizzera C, Châtre P, Lepage G, Martin S, Lebreton P. Prévalence du portage des entérobactéries BLSE chez des bovines maladies et des bovines Sains 591/76 RICAI 2007, Paris

[89] Canton R., T.M. Coque The CTX-M beta-lactamase pandemic, *Curr Opin Microbiol*, 9 (5) (2006); pp. 466–475

[90] Jiang Y , Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S , Li L Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')*-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China, *J. Antimicrob. Chemother.* (2008); Vol 61, p1003–6.

[91] Park, Y. J., J. K. Yu, S. Lee, E. J. Oh, G. J. Woo. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* (2007); 60: p868–71.

[92] Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D.F, Jacoby G.A, Hooper D.C. *Qnr* Prevalence in Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates From the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2006); 50: p2872–74.

[93] Amit K., Amin , David W. Wareham B Plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae isolates associated with community and nosocomial urinary tract infection in East London, UK, *J. Antimicrob. Chemother* ; article in press,(2009) (2965).



- [94] Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J.D., Timinouni.M. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie, Patho Bio, article in press.(2009) ; -d-09-00034.
- [95] Honoré S, Lascols C, Malin D, Targaouchi R, Cattoir V, Legrand P. Investigation of the new qnr-based mechanism of quinolone resistance among enterobacterial strains isolated in Henri-Mondor hospital 2002– 2005. Pathol Biol (Paris) (2006); 54 (5):pp270–9.
- [96] Lavilla S, González-López J, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM. Prevalence of qnr genes among extended spectrum betalactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother,(2008);61(2): p291–5.
- [97] Kim SY, Parkb YJ, Yub J K, Kima Y S, Hanc K Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC-producing Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, and Serratia marcescens: a multicenter study from Korea, Diag. Micro. Infec. Dis; (2009); 63: pp314-18
- [98] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, and Arakawa Y, New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an Escherichia coli Clinical Isolate, J. Antimicrob.Chemother., (2007).;51;. 9; p3354–60.



Webographie

- 15) (www.antibiotiques.org)
46) (<http://www.antiinfectieux.org>).
61) www.lahey.org/studies

Annexes

Annexe 1

Milieu de culture

• **Bouillon LB (Lura-Bertani)**

Peptone-----10g

Extrait de levure-----5g



Na Cl----- 10g
Asp. H₂O-----100ml

PH 7 et autoclaver à 121°C pendant 20min.

- **Milieu LB gélosé**

Peptone-----10g
Extrait de levure-----5g
Na Cl----- 10g
Agar-----1.5g

PH 7

- **Milieu MH (Muller-Hinton) gélosé.**

Infusion de viande de bœuf-----300,0 ml
Peptone de caséine-----17.5g/l
Amidon de maïs----- 1,5 g
Agar-----17,0 g

pH = 7,4

Annexe :2

- **Réactifs et tampons**

- **TBE (Tris Borate EDTA) 10×**

Tris base-----110g
Acide borique-----55 g
EDTA----- 40ml
H₂O-----1 litre

- **LE BLEU DE BROMOPHENOL**

EDTA-----25Mm.
SDS-----2%.
Glycérol-----25%.
Bleu de bromophénol-----0.12%.

- **solution tampon A (solution de pré-lyse)**



Acide Tris-acétique -----400mM

pH =8.

EDTA-----20mM

(agent Chélateur de la bicouches lipidiques disodiques).

Ajuster le pH à 8avec de l'acide acétique.

• **Solution B.**

Acétate de sodium -----40 .82g

H₂O-----

Annexe :3

| Code des souches de reference (temoins positifs) | | |
|--|---------------|--------------|
| gene | espece | code |
| <i>Tem-1</i> | salmonella sp | U2A1446 |
| <i>shv</i> | salmonella sp | U2A1446 |
| <i>cit</i> | K.oxytoca | U2A1891 |
| <i>Mox</i> | K.pneumoniae | U2A2239 |
| <i>dha-1</i> | K.pneumoniae | U2A2240 |
| <i>acc-1</i> | K. Pneumoniae | U2A2241 |
| <i>aac(6`)-Ib</i> | E.Coli | U2A1528 |
| <i>qnrA</i> | E.Coli | U2A2118 |
| <i>qnrB</i> | E.Coli | U2A2119 |
| <i>qnrS</i> | E.Coli | U2A2120 |
| <i>CTX-M-1</i> | E.Coli | U2A1790 |
| <i>qepA</i> | E.Coli | TOP10/PAT791 |

Annexe: tableau de CA-SFM (COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE)

| antibiotique | charge de disque | diamètres critiques(mm) | |
|--------------|------------------|-------------------------|------|
| | | S | R |
| AK | 30 µg | ≥ 17 | < 15 |
| ATM | 30 µg | ≥ 27 | < 21 |
| CAZ | 30 µg | ≥ 26 | < 19 |
| CFM | 10 µg | ≥ 25 | < 22 |
| CIP | 5 µg | ≥ 25 | < 22 |

| | | | |
|-----|---------------|------|------|
| GM | 15 µg(10UI) | ≥ 18 | < 16 |
| CRO | 30 µg | ≥ 26 | < 23 |
| CS | 50 µg | ≥ 15 | < 15 |
| ETP | 10 µg | ≥ 28 | < 26 |
| IPM | 10 µg | ≥ 24 | < 17 |
| K | 30 UI | ≥ 17 | < 15 |
| TOB | 10 µg | ≥ 18 | < 16 |
| SAM | 10/10 µg | ≥ 19 | < 16 |
| SXT | 1,25/23,75 µg | ≥ 16 | < 13 |
| TCC | 75/10 µg | ≥ 24 | < 22 |
| TE | 30 UI | ≥ 19 | <17 |
| TMP | 5 µg | ≥ 20 | < 16 |
| NA | 30 µg | ≥ 20 | < 15 |

Annexe : tableau de la confirmation des blse et ampc par le testt de double diffusion

| | | CTX30 | CTX+C | CTX CX |
|-----------|----------|--------|--------|--------|
| BLSE | CTX+C ou | ≥ 5 mm | - | - |
| | CTXCC | - | < 5mm | ≥ 5 mm |
| Ampc | CTXCX ou | ≥ 5 mm | - | - |
| | CTXCC | - | ≥ 5 mm | < 5mm |
| BLSE+Ampc | CTX+C et | < 5 mm | - | - |
| | CTXCC | - | ≥ 5 mm | ≥ 5 mm |