



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantin I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse Présentée pour l'obtention du  
**Diplôme de Doctorat en Sciences**

Filière : Biochimie

Spécialité : Biochimie Microbienne

Présentée et soutenue par :

**MEZIANI Meriem**

Intitulée :

---

**Analyse moléculaire et étude de la résistance aux antibiotiques  
des souches d'*Escherichia coli* productrices de  $\beta$ -lactamases à  
spectre étendu (BLSE) isolées au CHU de Constantine**

---

**Membres du jury :**

**Présidente :** Satta Dalila (Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1)

**Directeur de thèse:** Benlabeled Kaddour (Professeur, Université Constantine 3).

**Examineurs :**

Sekhri-Arafa Nedjoud (Maitre de conférences A, Université Frères Mentouri Constantine 1)

Benmhidi Messaoud (Maitre de conférences A, Faculté de Médecine, Université de Batna)

Laouar Hocine (Professeur, Université Constantine 3).

***Année universitaire  
2020 - 2021***

## REMERCIEMENTS

Avant tous je remercie **Dieu, Allah tout puissant**, le plus grand merci lui revient de m'avoir guidé vers le droit chemin, de m'avoir donné la force, le courage et de m'avoir aidé tout le long de mes études.

Ce travail a été réalisé au sein de deux laboratoires : laboratoire de bactériologie au CHU de Constantine, **Algérie** et le laboratoire du centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, **Belgique**.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse **Professeur Benlabed Kaddour**, Chef du Laboratoire de Bactériologie au CHU de Constantine, pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant au sein de son laboratoire. Je lui exprime ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'il a porté à cette thèse, pour ses encouragements, sa disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à mon égard.

Je voudrais également exprimer ma profonde reconnaissance au **Pr Youri Glupczynski**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser la partie importante de ma thèse et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à son bon déroulement.

J'adresse mes vifs remerciements par ailleurs au :

- ✓ **Professeur Satta...**, pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.
- ✓ **Maitre de conférences A Sekhri Arafa Nedjouda**, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.
- ✓ **Professeur...batna...** pour m'avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner ma thèse et de se déplacer à Constantine pour participer à mon jury.
- ✓ **Professeur A LAOUER Hocine** pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ma thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe de recherche du centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, **Belgique**, pour leur accueil, leur sympathie et leurs idées constructives, ainsi que mes collègues du département de Microbiologie de l'université de Constantine 1 : **Maitre de conférences B Abdelazziz Ouided, Maitre de conférences A Benkahoul Malika**, pour leur gentillesse et leur soutien moral.

Enfin, mes remerciements s'adressent vivement à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicaces

Je dédie le fruit de ce travail à ceux qui m'ont donné la vie, l'espoir et l'encouragement durant toute mon existence :

### A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde. Que DIEU **ALLAH** te garde pour moi.....

### A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que Dieu **ALLAH** te donne longue vie et te protège pour moi.....

## Résumé

L'espèce *Escherichia coli* est parmi les bactéries responsables des infections nosocomiales et des épidémies. La résistance d'*E. coli* aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante du fait de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces microorganismes, responsables d'infections nosocomiales se retrouvent résistants à plusieurs familles d'antibiotiques comme les B-lactamines et les aminosides. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Le but de cette étude était d'étudier la résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées au CHU de Constantine entre 2013-2015, et la caractérisation des gènes *AmpC* ainsi que l'étude de la coexistence des gènes de l'ARNr 16S méthylases et des carbapénémases dans des Souches d'*Escherichia coli* productrices des BLSE.

235 souches d'*E. coli* ont été collectées et l'identification a été effectuée en utilisant les galeries biochimiques classiques et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, l'étude de sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose) a été réalisée selon les recommandations de CLSI. Une recherche phénotypique de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), et de carbapénémases a été également effectuée. Par ailleurs, les gènes de résistance aux antibiotiques ont été caractérisés par les techniques de Biologie Moléculaire (PCR et séquençage). Ensuite, la détermination du clone ST131 et les groupes phylogénétiques des souches d'*E. coli* BLSE a été réalisée en utilisant respectivement la PCR spécifique ciblant le gène *papB* selon la méthode de Clermont et al., 2009 pour la détection du clone ST131 et la PCR des phylogroupes selon la méthode révisée de Clermont et al., 2013.

Dans cette étude on rapporte pour la première fois la description des souches d'*E. coli* co-exprimant à la fois les gènes *ArmA*, *OXA-48*, *CMY-16* et *TEM-1*. Ces souches isolées au CHU de Constantine étaient résistantes aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides par production de BLSE, des céphalosporinases, des carbapénémases et des méthylases de l'ARNr 16S. Soulignant ainsi l'augmentation de la fréquence des souches d'*E. coli* multirésistantes, ce qui nécessite d'établir des mesures de contrôle dans les hôpitaux algériens pour éviter leur diffusion.

**Mots clés :** *E. coli*, résistance aux antibiotiques, BLSE, 16S ARNr méthylases (*armA*), *CMY-16*, *OXA-48*, CHU de Constantine.



## الملخص

تعتبر فصيلة *Escherichia coli* من بين البكتيريا المسؤولة عن العدوى والأوبئة في المستشفيات. مقاومة *Escherichia coli* للمضادات الحيوية في تطورها مثير للقلق في جميع أنحاء العالم بسبب إنتاج B-lactamases (ESBL). هذه الكائنات الحية الدقيقة، المسؤولة عن العدوى في المستشفيات، مقاومة لعدة عائلات من المضادات الحيوية مثل بيتا لاكتاماز وأمينوغليكوزيدات. تمثل زيادة النسبة في مقاومة المضادات الحيوية وانتشارها في هذا النوع مشكلة صحية عامة عالمية. كان الهدف من هذه الدراسة هو دراسة مقاومة المضادات الحيوية لسلاسل كتييريا *E. coli* في المستشفى الجامعي قسنطينة بين 2013-2015، ودراسة جينات *AmpC* وكذلك دراسة التعايش بين جينات *méthylases de 16S ARNr* و *carbapenemases* في سلالات *Escherichia coli* المنتجة ل BLSE.

235 عينة من *E. coli* تم عزلها وتحديدتها باستخدام تحاليل كيميائية حيوية وتم تأكيدها بواسطة مطياف الكتلة (MALDI-TOF-MS). بعد ذلك، تم إجراء دراسة حساسية المضادات الحيوية (طريقة انتشار الأقراس على أجسام) وفقاً لتوصيات CLSI. كما تم إجراء بحث مظهري لإنتاج BLSE و *carbapenemases* بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة جينات مقاومة المضادات الحيوية تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR et séquençage). حدد ذلك، clone ST131 و *groupes phylogénétiques* لسلاسل *E. coli* BLSE باستخدام PCR المحدد الذي يستهدف جين *papB* وفقاً لطريقة Clermont et al. 2009 لاكتشاف clone ST131 و PCR ل *phylogroupes* وفقاً للطريقة المعتمدة ل Clermont et al. 2013 على التوالي.

في هذه الدراسة، تم لأول مرة إيجاد سلالات كتييريا *E. coli* المعبرة في نفس الوقت عن كل من جينات *ArmA* و *OXA-48* و *CMY-16* و *TEM-1*. هذه السلالات المعزولة في المستشفى الجامعي قسنطينة مقاومة ل  $\beta$ -lactamines و aminoglycosides عن طريق إنتاج BLSE و *cephalosporinases* و *carbapenemases* و *16S ARNr methylases*. زيادة وتيرة سلالات كتييريا *E. coli* المقاومة للأدوية المتعددة، يتطلب وضع تدابير للمراقبة في المستشفيات الجزائرية لمنع انتشارها.

**الكلمات المفتاحية:** *E. coli*، مقاومة المضادات الحيوية، BLSE، *16S rRNA methylases (armA)*، *CMY-16*، *OXA-48*، CHU de Constantine.

## Abstract

The species *Escherichia coli* is among the bacteria responsible for nosocomial infections and epidemics. The resistance of *E. coli* to antibiotics is undergoing a worrying worldwide development due to the production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). These microorganisms, responsible for nosocomial infections, are found to be resistant to several families of antibiotics such as  $\beta$ -lactams and aminoglycosides. The increase and spread of antibiotic resistance in this species represents a major global public health problem. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance of strains of *E. coli* isolated at the University Hospital of Constantine between 2013-2015, and the characterization of AmpC genes as well as the study of the coexistence of 16S rRNA methylase genes and carbapenemases in ESBL-producing strains of *Escherichia coli*.

235 strains of *E. coli* were collected and identification was performed using standard biochemical galleries and confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Then, the antibiotic sensitivity study (method of diffusion of discs on agar) was carried out according to the recommendations of CLSI. Phenotypic research of the production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and carbapenemases was also performed. In addition, the antibiotic resistance genes have been characterized by Molecular Biology techniques (PCR and sequencing). Next, the determination of the ST131 clone and the phylogenetic groups of the strains of ESBL *E. coli* was carried out using respectively the specific PCR targeting the *papB* gene according to the method of Clermont et al., 2009 for the detection of the ST131 clone and the PCR of phylogroups according to the revised method of Clermont et al., 2013.

In this study, we report for the first time the description of *E. coli* strains co-expressing both the *ArmA*, *OXA-48*, *CMY-16* and *TEM-1* genes. These strains isolated at the University Hospital of Constantine were resistant to  $\beta$ -lactams and aminoglycosides by production of ESBLs, cephalosporinases, carbapenemases and 16S rRNA methylases. Which shows the increased frequency of multidrug-resistant strains of *E. coli*, and which requires establishing control measures in Algerian hospitals to prevent their spread.

**Key words:** *E. Coli*, antibiotic resistance, ESBL, 16S rRNA methylases (*armA*), *CMY-16*, *OXA-48*, CHU of Constantine.

## Table des Matières

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
INTRODUCTION.....	1

### Première partie : Revue bibliographique

<b>1. Généralités sur l'espèce <i>Escherichia coli</i></b> .....	3
<b>2. Principales classes et familles d'antibiotiques</b> .....	9
2.1. Les bêta-lactamines.....	12
2.1.1. Structure et classification.....	12
2.1.2. Mode d'action.....	13
2.2. Aminosides.....	15
2.2.1. Structure et classification.....	15
2.2.2. Mode d'action.....	15
2.3. Quinolones.....	16
2.3.1. Structure et classification.....	16
2.3.2. Mode d'action.....	17
<b>3. <i>E. coli</i> et <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	18
3.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	18
3.2. Bêta-lactamases.....	19
<b>4. <i>E. coli</i> et Aminosides</b> .....	25
4.1. Mécanismes de résistance aux Aminosides.....	25

## Deuxième partie : Matériel et Méthodes

<b>1. Lieu d'étude</b> .....	27
<b>2. Prélèvements et souches bactériennes</b> .....	27
<b>3. Isolement et purification des souches</b> .....	28
<b>4. Identification des isolats</b> .....	28
4.1. Tests préliminaires .....	29
4.2. Tests biochimiques .....	30
4.3. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex) .....	32
<b>5. Etude de l'antibiorésistance des souches</b> .....	36
5.1. Réalisation de l'antibiogramme .....	36
<b>6. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques</b> .....	38
6.1. Recherche phénotypique de la production des BLSE .....	38
6.2. Détection phénotypique de la production des céphalosporinases et des méthylases de l'ARNr 16S .....	40
6.3. Détection phénotypique de la production des carbapénémases .....	41
<b>7. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques</b> .....	43
7.1. Extraction d'ADN .....	44
7.2. Amplification de l'ADN par PCR Multiplexe en point final (end-point multiplex PCR).....	44
7.3. Electrophorèse et révélation .....	46
7.4. Séquençage des produits d'amplification .....	47
<b>8. Identification du clone ST131 chez les souches d'<i>E. coli</i></b> .....	47
<b>9. Détermination des groupes phylogénétiques des souches d'<i>E. coli</i></b> .....	47

## Troisième partie : Résultats et discussion

<b>1. Souches étudiées et prélèvements</b> .....	48
1.1. Souches bactériennes isolées .....	48
1.2. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement .....	48
<b>2. Identification des souches d'<i>Escherichia coli</i></b> .....	51
2.1. Caractérisation par tests biochimiques .....	51
2.2. Caractérisation par MALDI-TOF .....	54
<b>3. Résistance aux antibiotiques</b> .....	55
3.1. Analyse des souches au CHU de Constantine .....	55
3.2. Analyse des souches au CHU de Namur, Belgique .....	61
<b>4. Détection phénotypique des BLSE</b> .....	63
4.1. Gélose ESBL (biomérieux) .....	64
4.2. Test de synergie .....	65
<b>5. Détection phénotypique des carbapénémases</b> .....	66
5.1. Test Carba NP Modifié .....	66
5.2. Test Phénotypique à la témocilline .....	68
5.3. Test de Hodge modifié .....	69
5.4. Test à EDTA-ETP .....	70
5.5. Test immunochromatographique (K-Set-OXA-48) .....	71
<b>6. Profil phénotypique des souches d'<i>E. coli</i> productrices des BLSE</b> .....	72
<b>7. Caractérisation moléculaire des BLSE</b> .....	75
<b>8. Caractérisation moléculaire des Céphalosporinases</b> .....	80
<b>9. Caractérisation moléculaire des Carbapénémases</b> .....	82
<b>10. Caractérisation moléculaire des résistances aux aminosides</b> .....	84

<b>11. <i>Escherichia coli</i> ST131 et phylogroupes .....</b>	<b>87</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>90</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>92</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>115</b>

## Liste des abréviations

**2-DOS** 2-désoxys- treptamine

**AAC** Amino-Acétyletransférases

**ADN** Acide Désoxyribonucléique

**Ag** antigène

**AM** Ampicilline

**AMC** Amoxicilline-clavulanate

**AmpC**  $\beta$ -lactamase de classe C ou céphalosporinase

**AN** Amikacine

**ANT** Nucléotidyltransférase

**APH** Phosphotransférases

**ArmA** Aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferase A

**ARN** Acide Ribonucléique

**ARNm** Acide ribonucléique messenger

**ATM** Aztréonam

**BGN** Bacilles à Gram négatif

**bla** Gène codant une  $\beta$ -lactamase

**BLSE**  $\beta$ -Lactamase à Spectre Etendu

**C1G** Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération

**C2G** Les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération

**C3G** Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

**C4G** Les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération

**CASE** Céphalosporinase

**CA-SFM** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CAZ** Ceftazidime

**CHUC** Centre hospitalo-universitaire de Constantine

**CIP** Ciprofloxacine

**CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMY** Céphamycinase

**CTX** Céfotaxime

**CTX-M** Cefotaximase Munich

**CXM** Céfuroxime

**DAEC** *E. coli* à adhésion diffuse

**DHA** DHArhan hospital

***E. coli*** *Escherichia coli*

**EAEC** *E. coli* entéroaggrégatives

**EDTA** Acide éthylènediamine tétra-acétique

**EHEC** *E. coli* enterohémorragiques

**EIEC** *E. coli* entéroinvasives

**EPEC** *E. coli* entéro-pathogènes

**ERT** Ertapénème

**ETEC** *E. coli* entérotoxinogènes

**ETP** Ertapénème

**FEP** Céfépime

**FOX** Céfoxitine



**GM** Gentamicine

**LPS** lipopolysaccharides

**MALDI-TOF** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

**MBL** Métallo- $\beta$ -lactamase

**MEM** Méropénème

**MLST** Multi-Locus Sequence Typing

**OXA** Oxacillinase

**PASE** Pénicillinase

**Pb** paire de bases

**PCR** polymerase chain reaction

**PLP** protéines liant les pénicillines

**SHV** Sulfhydryl reagent Variable

**SXT** Cotrimoxazole

**T.S.I** Triple Sugar Iron agar

**TEM** Témocilline

**TEM** Temoneira : nom du patient

**TZP** Pipéracilline-tazobactam

**UPEC** *E. coli* uropathogènes

Liste des figures

**Figure 1.** Ordre chronologique de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques en usage clinique.....10

**Figure 2.** Structure des  $\beta$ -lactamines.....14

**Figure 3.** Structures des aminocyclitols, noyaux de base des aminoglycosides.....16

**Figure 4.** Principales structures des quinolones.....18

**Figure 5.** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame.....19

**Figure 6.** Les BLSE dérivées de TEM.....23

**Figure 7.** Les BLSE dérivées de SHV.....23

**Figure 8.** Conservation des souches d'*Escherichia coli*.....28

**Figure 9.** Plan de la cible MALDI-TOF.....34

**Figure 10.** La plaque métallique MALDI-TOF après dépôt des échantillons.....35

**Figure 11.** Culture pure d'*E. coli* sur milieu TSA.....37

**Figure 12.** Exemple d'antibiogramme réalisé pour l'étude du profile de résistance.....37

**Figure 13.** Milieu chromogène ESBL (Biomérieux).....38

**Figure 14.** Disposition des disques d'antibiotiques et détection de la production des BLSE par le test de synergie.....40

**Figure 15.** Étapes de réalisation du test Coris Bioconcept.....43

**Figure 16.** Répartition des souches d'*E. coli* selon l'origine du prélèvement.....48

**Figure 17.** Répartition des souches d'*Escherichia coli* parmi les prélèvements cliniques....50

**Figure 18.** Culture d'*Escherichia coli* sur gélose Hektoen.....51

**Figure 19.** Aspect du milieu TSI avec *E. coli* (test positif).....52

**Figure 20.** Aspect du milieu mannitol-mobilité avec *E. coli* (test positif).....52

**Figure 21.** Aspect du milieu citrate de Simmons avec *E. coli* (test négatif).....53

**Figure 22.** Aspect du milieu urée-indole avec *E. coli* (uréase négative).....53

**Figure 23.** Aspect du test indole positif avec *E. coli*.....54

**Figure 24.** Souche d'*E. coli* avec phénotype BLSE.....63

<b>Figure 25.</b> Détection de la production de $\beta$ -lactamase à spectre étendu sur milieux ESBL Biomérieux avec <i>E. coli</i> .....	64
<b>Figure 26.</b> Test de synergie positif de quelques souches d' <i>E. coli</i> BLSE+.....	65
<b>Figure 27.</b> Test Carba NP positif avec deux souches d' <i>E. coli</i> (EC 175, EC 178).....	67
<b>Figure 28.</b> Test phénotypique positif (à la témocilline et à la piperacilline-tazobactam).....	68
<b>Figure 29.</b> Test de Hodge modifié positif avec deux souches d' <i>E. coli</i> .....	69
<b>Figure 30.</b> Test à EDTA négatif chez une souche d' <i>E. coli</i> résistante à l'ertapénème.....	70
<b>Figure 31.</b> Test immunochromatographique (K-Set-OXA-48) positif à carbapénémases OXA-48.....	71
<b>Figure 32.</b> Fréquence des souches d' <i>E. coli</i> BLSE.....	72
<b>Figure 33.</b> Répartition des souches d' <i>E. coli</i> BLSE selon les prélèvements.....	73
<b>Figure 34.</b> Répartition des souches d' <i>E. coli</i> BLSE selon les services d'origine.....	74
<b>Figure 35.</b> Profil électrophorétique des BLSE type CTX-M.....	77
<b>Figure 36.</b> Profil électrophorétique des BLSE de type SHV / TEM et B-lactamases OXA-1/30.....	78
<b>Figure 37.</b> Profil électrophorétique des B-lactamases de type AmpC.....	81
<b>Figure 38.</b> Profil électrophorétique des gènes codant des méthylases de l'ARNr 16S.....	86

Liste des tableaux

**Tableau 1.** La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012.....3

**Tableau 2.** Classification des antibiotiques selon leurs modes d'action.....11

**Tableau 3.** Antibiotiques testés vis-à-vis des souches d'*E. coli*.....36

**Tableau 4.** PCR multiplexe des gènes (TEM, SHV).....44

**Tableau 5.** PCR multiplexe des gènes (CTX-M groupes 1, 2, 9).....45

**Tableau 6.** PCR multiplexe des gènes (AmpC).....45

**Tableau 7.** PCR multiplexe des gènes (ArmA, RmtA, RmtC).....46

**Tableau 8.** PCR multiplexe des gènes (RmtB, RmtD, npmA).....46

**Tableau 9.** Répartition des souches d'*E. coli* selon l'origine du prélèvement.....48

**Tableau 10.** Répartition des souches d'*Escherichia coli* parmi les prélèvements cliniques  
n= 235.....49

**Tableau 11.** Interprétation des scores d'identification bactérienne par MALDI-TOF.....55

**Tableau 12.** Taux de résistance aux antibiotiques des 235 souches d'*E. coli* au CHU de  
Constantine.....57

**Tableau 13.** Profil de résistance des deux souches d'*E. coli* résistantes à l'Ertapénème.....58

**Tableau 14.** Taux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées dans différents  
hôpitaux (l'ouest et l'est algérien).....59

**Tableau 15.** Répartition des phénotypes de résistance aux Béta-lactamines selon les  
hôpitaux..... 60

**Tableau 16.** Le profil de résistance des souches d'*E. coli* BLSE.....62

**Tableau 17.** Interprétation des résultats du Carba NP test modifié.....66

**Tableau 18.** Répartition des souches d'*E. coli* BLSE selon la nature des prélèvements.....73

**Tableau 19.** Amorces utilisées pour les réactions de PCR multiplexe des gènes codant des  
BLSE.....76

**Tableau 20.** PCR multiplexe des carbapénémases.....82

**Tableau 21.** Amorces utilisées pour les réactions de PCR multiplexe des gènes codant des méthylases de l'ARNr 16S.....85

**Tableau 22.** Groupes phylogénétiques et ST131 chez des souches d'*E. coli* BLSE.....88

# **Introduction**

## Introduction

La découverte des antibiotiques a constitué une véritable révolution dans le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ces molécules ont été considérées comme étant des armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. De nombreux antibiotiques ont été découverts. Il s'agit entre autres des  $\beta$ -lactamines, des aminosides, des quinolones, des cyclines [1]. Cependant, leur utilisation abusive et incontrôlée a conduit à une antibiorésistance et a une augmentation du taux de morbidité et de mortalité [2].

La lutte contre les maladies infectieuses est une priorité de santé dans les pays en voie de développement. Toutefois, cette lutte est aujourd'hui compromise par certaines pratiques récurrentes dans nos sociétés. Ce sont, la forte pression de sélection des antibiotiques, l'automédication et la vente anarchique de médicaments en dehors des structures légales qui favorisent l'émergence et la propagation de bactéries multirésistantes (BMR). Parmi ces BMR, sont incluses les entérobactéries, constituées d'un ensemble important de bactéries dont certaines sont pathogènes. Leur pathogénicité est soutenue par leur résistance aux antibiotiques, notamment aux  $\beta$ -lactamines, par la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE), qui est souvent associée à la résistance à certaines familles d'antibiotiques comme les aminosides [3].

Plusieurs mécanismes de résistance des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (EBLSE) aux antibiotiques ont été décrits, parmi lesquels l'inactivation enzymatique des antibiotiques, l'altération ou la modification des cibles auxquelles se lie l'antibiotique et l'expulsion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux [2].

Depuis le début des années 2000, la prévalence globale des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) a augmenté dans de nombreux pays [4]. Cette situation constitue un problème majeur de santé publique car ces bactéries, non seulement résistantes à la plupart des  $\beta$ -lactamines, mais présentent souvent des résistances associées à d'autres classes d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine [5]. Au cours de la dernière décennie, les souches d'Entérobactéries Productrices de Carbapénémase ont également émergé et sont devenues endémiques dans certaines régions du monde [6, 7].

Les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*, sont des bactéries colonisatrices du tractus gastro-intestinal ayant le pouvoir de provoquer de très nombreuses infections, même chez des sujets sans pathologie. *E. coli*, représente la première cause d'infection nosocomiale

dans plusieurs pays [8]. Les souches sauvages sont naturellement sensibles à de très nombreux antibiotiques. Les différents mécanismes de résistance acquise au sein de cette espèce, ont conduit à l'apparition des souches multirésistantes, confrontant parfois les cliniciens à des quasi-impasses thérapeutiques. La multirésistance des souches d'*E. coli* est essentiellement liée à la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE), à l'hyperproduction de céphalosporinases ou à la production de carbapénémases, qui sont souvent associées à la résistance aux aminosides [9].

Dans la résistance des *E. coli* productrices de BLSE aux aminosides, la méthylation de l'ARN ribosomique 16S a émergé comme un nouveau mécanisme de résistance qui confère une résistance de haut niveau à tous les aminosides. Les gènes codant pour ces méthyltransférases sont généralement situés sur des plasmides dont certains (59%) portent également d'autres gènes de résistance tels que les gènes *AmpC* [10].

La survenue d'infections, à *E. coli*, intraitables par des antibiotiques représente un problème majeur de santé publique. Les infections causées par ces bactéries multirésistantes conduisent à l'augmentation des coûts des soins, à des hospitalisations prolongées, à des échecs thérapeutiques et à un taux élevé de morbidité et de mortalité. En 2008, un clone de ST131 a été identifié sur 3 continents. Il a été montré, en 2010, que ce clone était à l'origine de la majorité des infections à *E. coli* multirésistantes (MDR) [11].

Plusieurs études ont rapporté l'isolement des souches multirésistantes d'*E. coli* dans les hôpitaux algériens [143]. Ces études ont été réalisées dans les différents hôpitaux du Centre, de l'Est et de l'Ouest de l'Algérie. Cependant, l'étude de la résistance aux antibiotiques, chez *E. coli* au CHU de Constantine à l'Est algérien reste rare. Dans ce cadre, Les objectifs de cette thèse étaient l'étude de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'analyse moléculaire des souches d'*E. coli* isolées au CHU de Constantine, et la caractérisation des gènes *AmpC* et l'étude de la coexistence des gènes de l'ARNr 16S méthylases et des carbapénémases dans des Souches d'*Escherichia coli* productrices des BLSE.

Cette thèse s'articule autour de 3 parties. La première partie porte principalement sur une synthèse bibliographique concernant la description de l'espèce *E. coli*, les antibiotiques, leur mode d'action et les mécanismes de résistance des *E. coli* aux antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections dues à ce germe. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. Enfin, la troisième partie porte sur l'ensemble des résultats obtenus et la discussion qui en découle.



**Première partie**

**Synthèse**

**bibliographique**

## Chapitre 1. Généralités sur l'espèce *Escherichia coli*

### 1. Taxonomie et définitions

*Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*, elle a été isolée pour la première fois par le pédiatre Allemand Theodore Escherich en 1885, qui l'a identifiée dans des selles de nourrissons. Il a décidé en premier lieu de lui donner le nom de *Bacterium coli commune* [12, 13]. Son nom actuel lui est donné par Castellani et Chaombers en 1919 [14]. Depuis ce temps, *E. coli* est devenue la bactérie la plus étudiée et la mieux connue.

La taxonomie est l'ensemble des principes et théories qui permettent de valider le classement des micro-organismes ou taxons. *Escherichia coli* est une bactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, c'est une espèce bactérienne du genre *Escherichia*, ordre des *Enterobactériales*, phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*. (Tableau 1) [15].

**Tableau 1** : La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey'smanual 2012. [15]

Règne	Bacteria
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobactériales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend une centaine d'espèces dont les plus isolées en pathologie clinique et qui ont un intérêt médical appartiennent à 12 genres qui sont : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Morganella*, *Shigella*, *Yersinia*. Le genre *Escherichia* compte cinq autres espèces en plus d'*Escherichia coli* qui sont : *Escherichia abertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermani*, *Escherichia velneris* et *Escherichia blattae*. Les caractères biochimiques permettent de les identifier dont chaque espèce est caractérisée par des caractéristiques biochimiques spécifiques.

*E. coli* est une bactérie qui appartient à la microflore commensale intestinale de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. Elle se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon. Le mucus constitue une niche écologique favorable pour

son développement de par ses conditions de température, d'humidité, et de disponibilité en nutriments. Cette bactérie appelée colibacille ou bacille du colon est une bactérie colonisatrice du tube digestif de l'homme d'une manière asymptotique. Cette colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E. coli* lui permet de garder durant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore intestinale ou elle assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse [16, 17, 18].

*E. coli* est une bactérie ubiquitaire, elle peut transiter dans l'eau et les sédiments, elle est considérée comme un excellent indicateur de la contamination fécale de l'eau. Cette bactérie et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont également recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale [19, 13,20].

L'environnement constitue l'habitat secondaire des *E. coli* contrairement à l'habitat primaire plutôt défavorable à leur survie. Dans l'environnement, la bactérie *E. coli* est soumise à plusieurs facteurs influençant son développement de types biotiques et abiotiques [21, 22, 23]. Certaines souches de la bactérie *E. coli* sont capables de coloniser et de persister dans l'environnement hors de leur hôte [24]. Cette population dite colonisatrice de l'environnement est qualifiée de population naturalisée [25] ou de coliformes du microbiote environnemental [24].

Ce processus d'adaptation dans l'habitat secondaire a été identifié au niveau des coliformes fécaux environnementaux avec l'identification de la bactérie *E. coli* ayant la capacité à produire une capsule pour se protéger des agressions extérieures [26, 27]. Pour résister à la dessiccation et à la salinité les souches d'*E. coli* ont développé une capacité à produire des solutés organiques [28].

## **2. Caractères bactériologiques**

### **2.1. Caractères morphologiques**

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie de forme cylindrique (bâtonnets) ou coccobacillaire, mesurant approximativement 2µm à 4µm de long sur 0.6µm de large, Gram négatif, non sporulée. Elle se présente soit isolée ou groupée le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement sont regroupées en amas. Elles sont pourvues de cils, donc mobiles grâce à une ciliature péritriche [29].

## 2.2. Caractères cultureux

*E. coli* se développe sur les milieux gélosés en 24 heures à 37C° en donnant des colonies rondes dont le diamètre est de 2 à 3 mm, à bords réguliers, lisses et non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur Mac Conkey Les colonies d'*E. coli* Lactose-positif, sont de couleur rose à rouge, plates, sèches et de 2 à 3 mm de diamètre, elles sont généralement entourées d'une zone rose plus foncée des sels biliaires précipités. Les colonies *E. coli* Lactose-négatif produisent des colonies incolores sur Mac Conkey [30].

## 2.3. Caractères biochimiques

*E. coli* possède les caractères classiques de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie est aéro-anaérobie facultatif, elle a un métabolisme respiratoire et fermentaire, elle est dépourvue d'oxydase, catalase positive et nitrate réductase positive [31]. Elle possède également des caractères biochimiques spécifiques permettant le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille. Il s'agit de la production d'indole à partir de tryptophane, la fermentation du lactose, la production d'une  $\beta$ -galactosidase, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne [32].

## 2.4. Caractères antigéniques

Le premier système permettant la classification des souches de l'espèce *E. coli* a été la sérotypie établie par KAUFMAN qui correspond à une combinaison de certains antigènes de surface. L'utilisation de cette technique a permis d'identifier trois variétés d'antigènes : somatiques O, flagellaires H, capsulaires K [33]. L'identification des antigènes et sérogroupes a permis de différencier des souches pathogènes des souches commensales, car certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment [34, 35].

- Antigène somatique O

Il est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à coloration de Gram négative, il détermine le séro groupe. Ces antigènes sont composés de lipopolysaccharides (LPS) complexes. Certaines molécules de LPS permettent à la bactérie de se protéger contre l'action lytique du complément, la fixation des anticorps et la phagocytose [36].

- Antigène flagellaires H

L'antigène flagellaire H est de nature protéique, il entre dans la structure du flagelle responsable de la mobilité de la bactérie. Cette fonction est définie dans la pathogénie des *E. coli* uropathogènes (UPEC), certaines études ont montré que les flagelles facilitent l'ascension des souches UPEC de la vessie aux reins [37, 38]. La diversité des antigènes H tient à la variabilité des sous-unités de flagellines constituant le flagelle. Les souches d'*E. coli* qui ont perdu leur mobilité par perte d'expression du flagelle ; elles sont alors classées comme non immobiles (ou H-) [39].

- Antigènes de surface K

Les antigènes de surface aussi appelés antigènes de capsule ou d'enveloppe, ou encore antigène Vi chez *Salmonella*, ce sont des polyosides acides qui ont été divisés en trois types A, B et L. Lorsqu'ils sont présents ils masquent l'Ag O, et empêchent le sérotypage [40].

- ✓ L'antigène L : c'est le plus fréquent, il est thermolabile ; Le chauffage à 100°C pendant une demi-heure le détruit et démasque l'antigène O, le rendant accessible aux techniques de sérogroupage et provoque une perte du pouvoir antigénique, et du pouvoir de fixer les anticorps.
- ✓ L'antigène A : est plus rare, c'est un antigène capsulaire. L'Ag A est très thermostable, le chauffage à 100°C ne suffit pas à le détruire, il faut un autoclavage à 121°C durant une heure pour le détruire et démasquer l'antigène somatique.
- ✓ L'antigène B : est toujours présent chez les *Escherichia coli* entéropathogènes de gastro-entérite infantile. Il possède une thermolabilité intermédiaire entre les Ag L et A. Un chauffage à 100°C permet le sérogroupage mais ne supprime pas totalement l'antigène B. Un chauffage plus prolongé peut permettre de le détruire totalement.

### 3. Les phylogroupes d'*E. coli*

Un phylogroupe est le résultat de l'analyse phylogénétique qui permet la classification des individus en groupes en se basant sur l'identification de critères moléculaires communs. Dès les années 2000, en utilisant la technique de génotypage comme le ribotypage affiné par Multi-Locus Sequence Typing (MLST) et la PCR, l'espèce *E. coli* a pu être classée en sept groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D, E, et F) [41, 42, 43].

La prévalence et la répartition des souches d'*E. coli* appartenant aux phylogroupes (A, B1, B2 et D) chez les mammifères sont conditionnées par les caractéristiques de l'hôte

(alimentation, morphologie du tube digestif et masse corporelle) et par les facteurs environnementaux (géolocalisation et climat) [44].

Des études ont montré que les souches d'*E. coli* commensales font partie préférentiellement du phylogroupe A. Les souches pathogènes d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales semblent majoritairement associées au phylogroupe B2 et en minorité au phylogroupe D. Les souches responsables de diarrhées chroniques légères telles que les EPEC ne semblent pas être classées parmi un phylogroupe précis bien que certaines études les associent préférentiellement au phylogroupe B1 [45,46]. Deux études récentes ont rapporté que les souches d'*E. coli* pathogènes productrices de toxines comme les EHEC se répartissent préférentiellement entre les phylogroupes A et B1 [47, 48]. Toutefois certaines souches telles que celles du sérotype O157 :H7 appartiennent au phylogroupe E [49].

#### 4. Pouvoir pathogène d'*E. coli*

Les souches d'*Escherichia coli* sont présentes dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et de nombreux animaux, où elles jouent le rôle de bactéries commensales. Cependant, certaines souches peuvent être pathogènes et provoquer des infections intestinales responsables de gastro-entérites, et des infections extra-intestinales responsables d'infections urinaires, de péritonites, de pneumonies nosocomiales, de méningites ou encore de sepsis. En fonction des facteurs de virulence acquis par transfert horizontal, et des environnements colonisés, Les souches pathogènes d'*E. coli* sont classées en huit pathovars ou pathotypes [50].

Les souches de la bactérie *E. coli* à l'origine de maladies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Ces souches pathogènes sont classifiées en six pathotypes majeurs selon le type de maladie engendré et les facteurs de virulence associés. La majorité des *E. coli* pathogènes intestinaux appartient aux groupes phylogénétiques A/B1/E et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique et ils sont inclus dans ce groupe : Les *E. coli* enterohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) et les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) [51]. Les *E. coli* à l'origine de maladies extra-intestinales, ont acquis la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et de se propager dans l'organisme [52]. Elles représentent un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinales. Ce groupe comprend les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections urinaires et les *E. coli* associées à des méningites et des septicémies [53].

De plus, il existe des groupes distincts d'*E.coli* : le groupe des *E. coli* à adhérence invasive (AIEC) qui est associé à la maladie de Crohn [54, 55] et le groupe des *E. coli* productrices de Shigatoxines [56].

## Chapitre 2. Résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

### 1. Antibiotiques

#### 1.1. Définitions

Les antibiotiques sont des molécules capables d'inhiber la croissance bactérienne ou même de tuer les bactéries, sans affecter l'hôte. Ils permettent aux défenses naturelles du corps telles que le système immunitaire, de les éliminer. Ils agissent souvent en inhibant la synthèse d'une cellule bactérienne, la synthèse de protéines, l'ADN, l'ARN, par un agent désorganisant la membrane, ou d'autres actions spécifiques. Les origines principales d'antibiotiques sont souvent les champignons, mais parfois aussi les bactéries. Les antibiotiques sont des substances naturelles, hémi-synthétiques ou synthétiques, ayant subi des modifications chimiques (semi-synthèse) pour améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels. Aujourd'hui, la plupart des antibiotiques en usage clinique sont obtenus par semi-synthèse [57].

#### 1.2. Historique

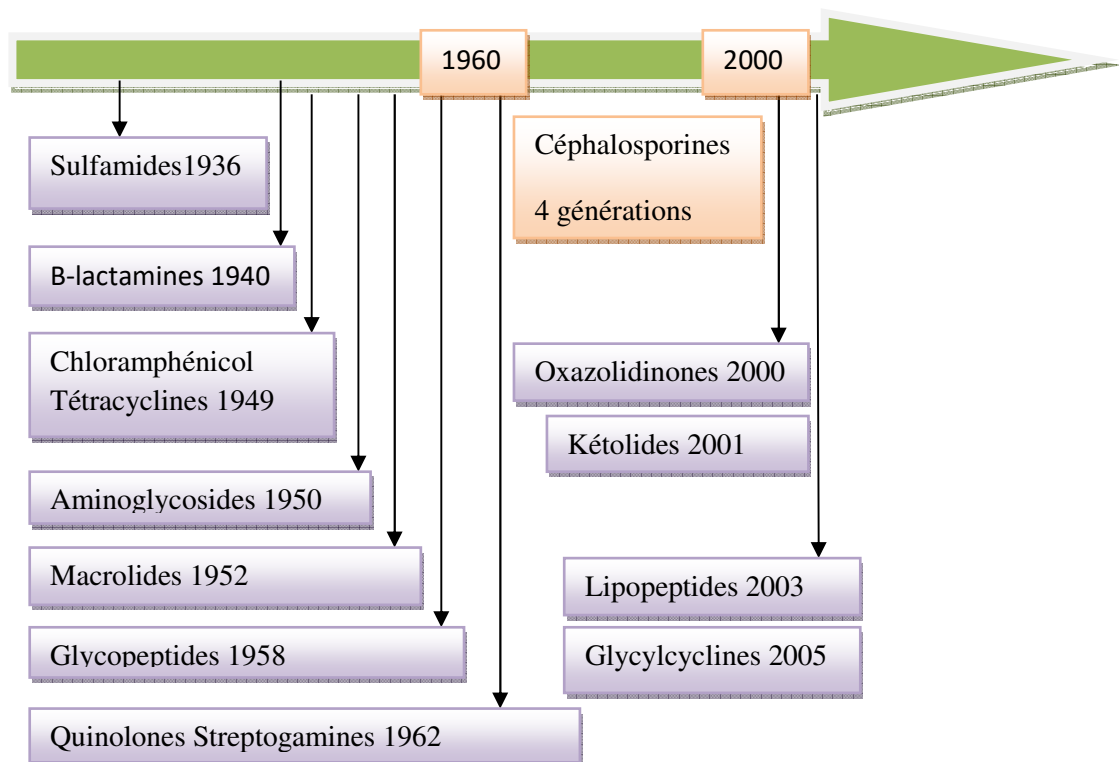
Tout a commencé en 1889 où l'Allemand Rudolf Emmerich a effectué des essais cliniques sur une substance antibiotique, la pyocyanase qui avait la capacité de détruire de nombreuses bactéries pathogènes, dont celles de la fièvre typhoïde, de la diphtérie, du charbon, de la peste, etc . Mais l'intérêt médical de cette molécule retomba rapidement, car le médicament étant instable et toxique. Quelques années plus tard, en 1928 Alexander Fleming, médecin, biologiste et pharmacologue britannique a découvert par hasard, qu'une ou des substances produites par un champignon, *Penicillium notatum*, avaient la capacité d'inhiber la croissance bactérienne. Il fut le premier à publier un article sur les effets antibactériens de la pénicilline. Quelques années plus tard, Howard Florey, Ernst Chain et Norman Heatley étendirent les travaux de Fleming ; Ils réussirent à faire produire et à purifier la pénicilline, prouvant ainsi son intérêt en tant que substance médicale. Alors que leurs recherches commençaient à être couronnées de succès, la Seconde Guerre mondiale a été déclarée. Le projet a été déplacé aux États-Unis pour le préserver des bombardements allemands, et les travaux se focalisaient sur la fabrication en grandes quantités de la moisissure produisant la pénicilline. L'objectif était de pouvoir fournir un médicament capable de traiter les nombreux blessés dus à la guerre. Le monde entier avait parlé alors de la pénicilline et de ses effets miraculeux. A La fin de la seconde guerre mondiale, un autre antibiotique a été découvert et devenu célèbre, la streptomycine. Produite par un micro-



organisme constituant la microflore du sol, *Streptomyces griseus*, cette substance a été découverte par Waksman en 1943. Cet antibiotique se révélait efficace contre les bactéries de certaines infections courantes, de la méningite et surtout de la tuberculose. La streptomycine a été le premier véritable médicament capable de lutter efficacement contre cette maladie chronique [58].

A la suite de la première mise en évidence de résistances, les antibiotiques semi-synthétiques et synthétiques ont été développés à partir de 1965. Entre 1990 et 2000 peu de molécules ont été commercialisées et il faudra attendre les années 2000, pour voir apparaître la synthèse du premier antibiotique de nouvelle génération, le Linézolide.

Depuis 1940 et jusqu'à 2005, on a assisté à la découverte et à la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques dont la chronologie est présentée dans la Figure 1.



**Figure 1** : Ordre chronologique de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques en usage clinique [59].

### 1.3. Critères d'efficacité d'un antibiotique

La prescription d'un antibiotique doit aboutir à l'efficacité thérapeutique et pour que l'antibiotique choisi puisse être actif sur les germes responsables de l'infection, il faut :

- qu'il possède un mode d'action qui lui permet d'agir sur la cible.

- qu'il parvienne là où est la bactérie et à des concentrations suffisamment élevées.
- qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre de détruire la bactérie (effet bactéricide) ou d'arrêter sa multiplication (effet bactériostatique).

L'objectif usuel de l'antibiothérapie est de diminuer au maximum le nombre de bactéries présentes pour que le système immunitaire puisse éliminer les bactéries restantes. Cependant, si le système immunitaire est affecté comme le cas des maladies auto-immunes, infection par le virus du SIDA, immunodépression suite à une chimiothérapie,...etc ou si l'infection fait courir un risque vital, il devient nécessaire que l'antibiotique détruise toutes les bactéries. Il faut aussi que l'antibiotique n'induisse pas ou peu d'effets indésirables inacceptables voir toxiques à d'autres niveaux et dégrade les autres organes sains.

## 2. Principales classes et familles d'antibiotiques

Il existe plusieurs modalités de classification des antibiotiques, ils sont classés selon leur structure chimique qui détermine leurs propriétés bactériologiques (mode d'action, mécanisme de résistance, spectre), pharmacologiques (mode d'admission, diffusion, élimination) et toxicologiques (effets indésirables et contre-indications) [60]. Ils peuvent être aussi classés selon leurs modes d'action (Tableau 2).

**Tableau 2** : Classification des antibiotiques selon leurs modes d'action [61].

Antibiotiques	Mode d'action
$\beta$ -lactamines Glycopeptides	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire
Polymyxines	Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique
Aminosides Macrolides Tétracyclines chloramphénicol	Inhibition de la synthèse protéique
Rifampicine Quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Sulfamides Triméthoprim	Inhibition des voies métaboliques de l'acide folique

Les principales familles d'antibiotiques utilisés en thérapie contre les entérobactéries, y compris *E. coli*, sont les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les quinolones [62].

## 2.1. Les bêta-lactamines

Les  $\beta$ -lactamines représentent la famille des antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Ce choix est principalement lié à leur pouvoir bactéricide, à leur faible taux de toxicité, et à la diversité de leurs structures [63].

### 2.1.1. Structure et classification

Toutes les molécules de la famille des  $\beta$ -lactamines possèdent un noyau  $\beta$ -lactame, qui est la partie efficace de la molécule. À partir de cette structure, cinq groupes ont été développés par adjonction d'un cycle latéral : les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Figure 2) [64, 65].

#### A)- Pénames (Pénicillines)

C'est le groupe le plus ancien caractérisé par le noyau péname. Selon la nature de la chaîne latérale, on distingue plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline), les amidinopénicillines (pivmecillinam), et la témocilline (dérivé de la ticarcilline) [66].

#### B)- Céphèmes (Céphalosporines)

Ils sont caractérisés par le noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution, ce qui explique la diversité de leurs propriétés antibactériennes, leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables. On distingue [64, 66]:

- Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (C1G) : elles sont actives sur les bactéries à Gram positif (céfalotine, céfazoline et céfalexine...).
- Les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération (C2G) : elles sont actives sur les bactéries à Gram négatif (céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan...)
- Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) : elles sont actives sur la plupart des entérobactéries (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone...).

- Les céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération (C4G) : Elles sont actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase (céfépime et cefpirome).

#### C)- Pénèmes (Carbapénèmes)

Les pénèmes sont des molécules caractérisées par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle  $\beta$ -lactame. Les carbapénèmes possèdent un très large spectre antibactérien. Ces molécules sont très utilisées contre les infections sévères à bactéries à Gram négatif. Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème [67].

#### D)- Monobactames

Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un noyau monocyclique, azétidine, associé au cycle  $\beta$ -lactame. L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé. Il est plus actif sur les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement sur les entérobactéries, pour lesquelles il a une activité comparable à celle des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération [66].

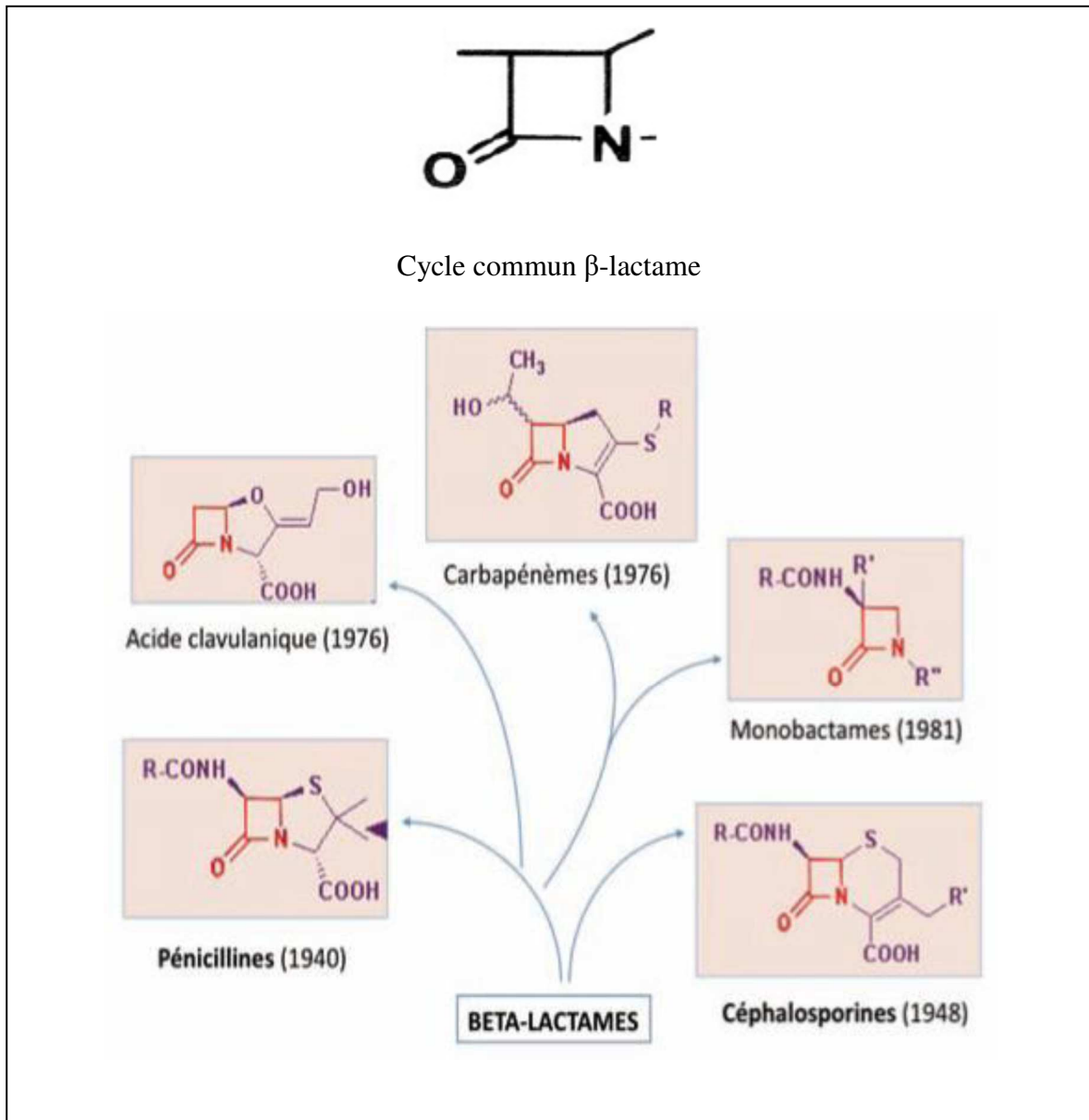
#### E)- Inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Certains inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) possèdent un noyau bêta-lactame. Ce sont des  $\beta$ -lactamines à faible activité antibactérienne. Ces inhibiteurs sont toujours utilisés en association à une  $\beta$ -lactamine. En effet, l'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin et la ticarcilline dans le Claventin, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline. Le spectre d'inhibition de ces molécules est limité aux pénicillinases [66].

### 2.1.2. Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane, polymère majeur de la paroi bactérienne, par inactivation des enzymes appelées protéines liant les pénicillines ou PLP qui sont des protéines membranaires et qui constituent les cibles des  $\beta$ -lactamines. Il s'agit d'enzymes d'activité variable de type transpeptidase, transglycosylase ou carboxypeptidase, ce sont des enzymes clés dans la synthèse du peptidoglycane qui assure la forme et l'intégrité de la cellule bactérienne. Les  $\beta$ -lactamines présentent une analogie structurale entre le noyau  $\beta$ -lactame et le dipeptide du pentapeptide constitutif du peptidoglycane, qui constitue le

substrat naturel des PLP. L'antibiotique se lie au site actif des PLP pour former un complexe acylenzyme covalent provoquant l'inactivation de ces enzymes PLP. L'effet d'une  $\beta$ -lactamine dépend de son affinité pour les différentes PLP. Cette liaison formée a deux conséquences : arrêt de la synthèse du peptidoglycane et de la croissance bactérienne en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet bactériostatique) (Tankovic, 2000) et elle entraîne également une activation dérégulée des autolysines bactériennes conduisant à la lyse bactérienne (effet bactéricide) [68, 69].



**Figure 2** : Structure des  $\beta$ -lactamines [70]

## 2.2. Aminosides

Les aminosides forment une classe d'antibiotiques qui occupe une place importante au sein de l'arsenal antibactérien hospitalier. Ils ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif. Ces antibiotiques sont utilisés en thérapeutique depuis la découverte de la streptomycine par Waksman et ses collaborateurs en 1944, ils sont utilisés dans le traitement des infections nosocomiales graves à bacilles à Gram négatif le plus souvent en association avec les  $\beta$ -lactamines ou les fluoroquinolones [71].

### 2.2.1. Structure et classification

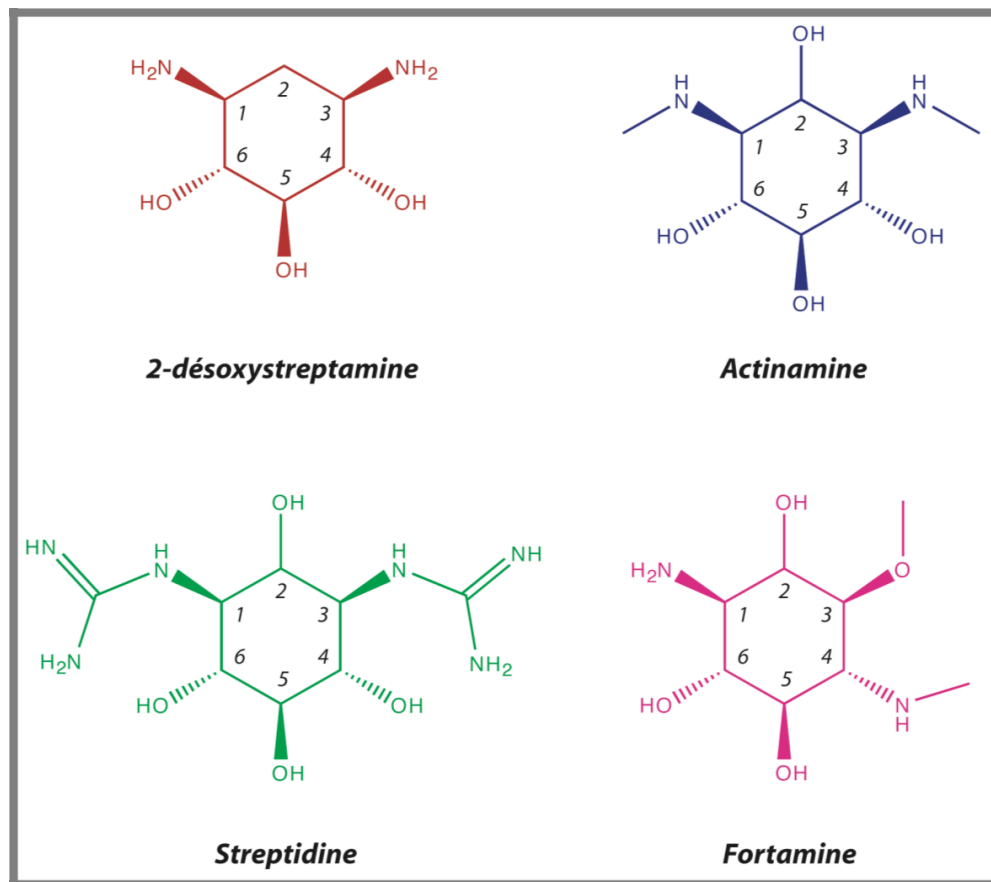
Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules formées d'un cycle central aminocyclitol saturé à 6 atomes de carbone relié par des liaisons glycosidiques à un ou plusieurs dérivés de sucres. Ce cycle central peut être la streptidine, l'actinamine ou la fortamine mais le plus souvent le 2-désoxy- treptamine (2-DOS) (Figure 3). Les composés contenant le cycle DOS sont classés en sous-familles en fonction de la substitution de ce cycle. On peut distinguer les aminosides où le cycle 2-DOS est substitué en position 4 et 5 (groupe 4,5-2- DOS : néomycine, paromomycine) ou en position 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS : amikacine, kanamycine, gentamicine, isépamicine, nétilmicine, tobramycine) [72].

Les Actinomycètes tels que *Streptomyces spp* et *Micromonospora spp* sont les producteurs naturels des aminosides. Ces actinomycètes ont une résistance intrinsèque aux aminosides, parce qu'ils possèdent le gène ARNr 16S méthyltransférase, qui peut conférer une résistance de la bactérie [73].

### 2.2.2. Mode d'action

Les aminosides ont pour principale cible le ribosome. La plupart des aminosides se fixent au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (Le site A) dans la sous-unité 30S du ribosome. Cette liaison inhibe la croissance des bactéries à travers le blocage de la synthèse des protéines, et peut aussi causer une mauvaise interprétation du code génétique, conduisant à la synthèse de protéines "nonsens" qui endommagent l'intégrité de la membrane cytoplasmique et facilitent l'entrée dans le cytoplasme de nouvelles molécules aminosides qui vont accroître les dommages cellulaires et entraîner la mort de la cellule. Les aminosides peuvent s'accumuler de façon irréversible dans la cellule bactérienne, altérer la synthèse de l'ADN ou dégrader l'ARN ou encore interagir avec le système de transport des électrons de la chaîne respiratoire

et provoquer des désordres ioniques importants dans la cellule bactérienne ce qui explique leur effet bactéricide rapide [74].



**Figure 3 :** Structures des aminocyclitols, noyaux de base des aminoglycosides [75]

### 2.3. Quinolones

Les quinolones sont des composés antibactériens synthétiques importants et efficaces dans le traitement des infections bactériennes et très largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. En tête de liste, l'acide nalidixique, qui a été décrit en 1962 [76, 77].

#### 2.3.1. Structure et classification

La structure chimique de ces molécules est un acide pyridine- $\beta$ -carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones se caractérisent par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (Figure 4) [78].

Les quinolones sont classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de mise sur le marché, on distingue [79] :

- Les quinolones de 1<sup>ère</sup> génération : utilisés dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries (acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique).
- Les quinolones de 2<sup>ème</sup> génération ou fluoroquinolones: ce sont des molécules présentant un spectre élargi à d'autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), à certains cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et aux bactéries intracellulaires (norfloxacin, ofloxacin, péfloxacin, ciprofloxacin).
- Les quinolones de 3<sup>ème</sup> génération ou fluoroquinolones anti-pneumococciques : ayant un spectre étendu à *Streptococcus pneumoniae* (sparfloxacin, lévofloxacin, moxifloxacin).
- Les quinolones de 4<sup>ème</sup> génération : présentent un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies strictes (trovafloxacin, gatifloxacin).

### 2.3.2. Mode d'action

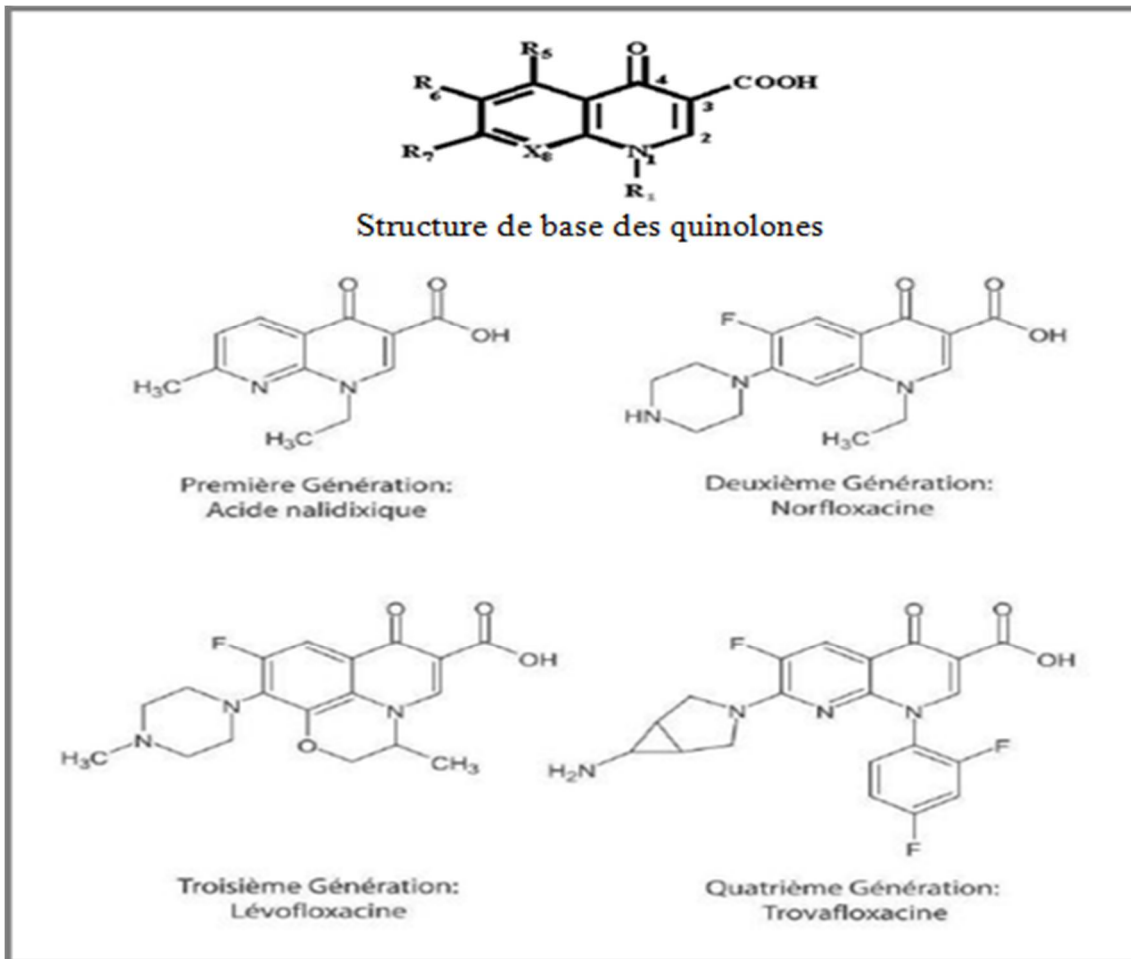
Les quinolones exercent une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse.

- Les quinolones inhibent les topoisomérase de type II (l'ADN gyrase) qui est responsable du surenroulement négatif dans la double hélice d'ADN bactérien lors de sa réplication. L'ADN gyrase est constituée de deux sous-unités A et B. La sous-unité A est une protéine codée par le gène *gyrA* : elle est essentiellement impliquée dans la coupure des brins d'ADN précédant le surenroulement et constitue la cible principale des quinolones chez les bactéries à Gram négatif. La sous-unité B est une protéine codée par le gène *gyrB* : elle est responsable de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions catalysées par l'enzyme [80].
- l'ADN topoisomérase IV constitue une seconde cible intracellulaire des quinolones. Elle est constituée de deux sous-unités ParC et ParE qui sont codées respectivement par les gènes, *parC* et *parE*. Cette enzyme a une activité de décaténation, qui permet la séparation des chromosomes répliqués à la fin d'une séquence de réplication [80].

Les quinolones interagissent avec le complexe enzyme-ADN (la gyrase ou la topoisomérase IV) et forment Le complexe quinolone-enzyme-ADN en provoquant des modifications conformationnelles entraînant une désactivation de l'enzyme ce qui bloque la progression de la réplication et qui inhibe la synthèse de l'ADN et conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne (Soussy, 2006). De plus, les coupures d'ADN double brin stabilisées par les quinolones constitueraient des lésions non réparables de l'ADN, capables de



déclencher l'inactivation de certaines synthèses protéiques responsable de l'effet bactéricide de ces antibiotiques [81, 82].



**Figure 4 :** Principales structures des quinolones [83]

### 3. *E. coli* et $\beta$ -lactamines

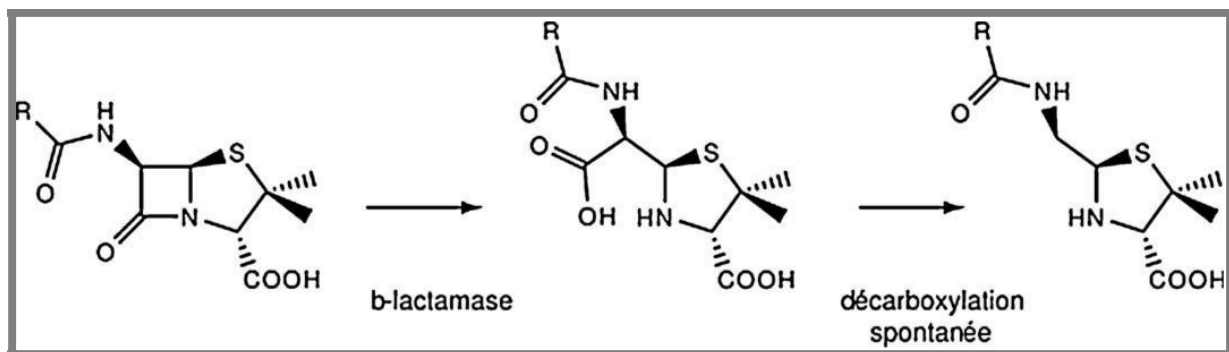
#### 3.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

De manière générale, Les mécanismes de résistance naturelle ou acquise aux  $\beta$ -lactamines utilisés par les entérobactéries, y compris *E. coli*, sont de quatre ordres parfois plus ou moins associés ; il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, l'expression d'une pompe d'efflux actif, la modification d'affinité de la cible (PLP), mais le plus souvent, il s'agit de l'inactivation enzymatique par les  $\beta$ -lactamases, des enzymes détruisant les  $\beta$ -lactamines [84].

### 3.2. Bêta-lactamases

Les  $\beta$ -lactamases ont été identifiées pour la première fois en 1940 par Abraham et Chain, qui ont découvert une enzyme capable d'inhiber l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; appelée pénicillinase [85].

Les bêtalactamases sont des enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines en ouvrant le cycle bêtalactame en créant un intermédiaire acylenzyme instable menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question. Elles catalysent de manière irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau  $\beta$ -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acylenzyme qui sera par la suite dégradé en acide inactif (Figure 5). Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif [66].



**Figure 05:** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame [66]

#### 3.2.1. Classification des $\beta$ -lactamases

Deux classifications sont actuellement utilisées. Ces enzymes sont classées en fonction de leur séquence en acides aminés ou de leur spectre d'activité enzymatique [86, 87].

- **La classification structurale de Ambler**

Proposée par Ambler en 1980, cette classification est basée sur la similarité des séquences entre les différents membres des  $\beta$ -lactamases, notamment la séquence primaire en acide aminés d'éléments conservés du site actif. Cette classification est constituée de quatre groupes moléculaires : les  $\beta$ -lactamases de classe A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont appelées sérines enzymes tandis que celles de classe B sont appelées métallobêta-

lactamases (carbapénèmases) dont les enzymes comportent deux atomes de zinc au niveau de leur site actif [88].

- La classe A correspond aux pénicillinases et aux  $\beta$ -lactamases chromosomiques ou plasmidiques inhibées par l'acide clavulanique.
- La classe B comprend les métalloenzymes, carbapénèmases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA).
- La classe C regroupe les céphalosporinases résistantes à l'acide clavulanique, habituellement chromosomiques.
- La classe D regroupe les oxacillinases de sensibilité variable à l'acide clavulanique.

- **La classification fonctionnelle de Bush**

Elle repose sur les propriétés fonctionnelles de l'enzyme, sur le spectre de substrats préférentiels des enzymes et sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des  $\beta$ -lactamases aux inhibiteurs, dans cette classification ces enzymes sont divisées en quatre groupes avec plusieurs sous-groupes. Cependant, la limite évidente de cette classification phénotypique de  $\beta$ -lactamases est que différentes mutations ponctuelles des gènes de  $\beta$ -lactamases peuvent influencer leur susceptibilité à ces substrats et inhibiteurs en modifiant les spectres d'activité pour les différents substrats ou pour les inhibiteurs contrairement à la classification d'Ambler qui reste valable pour les enzymes mutées [87].

- Le groupe 1 regroupe les  $\beta$ -lactamases chromosomiques de la classe C (type AmpC). Les bactéries productrices de ces enzymes sont résistantes à bas niveau aux pénicillines, aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, à la ceftioxime. La production de ces enzymes est inductible par différents antibiotiques parmi lesquels: la ceftioxime, l'acide clavulanique ou l'imipénème.
- Le groupe 2 comporte des  $\beta$ -lactamases le plus souvent inhibées par l'acide clavulanique. La plupart de ces enzymes sont plasmidiques et toutes appartiennent à la classe moléculaire A, exceptées les oxacillinases qui appartiennent à la classe D.
- Le groupe 3 regroupe les enzymes de la classe B les métallo- $\beta$ -lactamases conférant la résistance à la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamines (carbapénèmes, céphalosporines et pénicillines) exceptés les monobactames et sont inhibées par l'EDTA mais pas par l'acide clavulanique.
- Le groupe 4 comporte peu d'enzymes, insensibles à l'acide clavulanique.

### 3.2.2. Différents types de $\beta$ -lactamases

#### A)- céphalosporinases chromosomiques

*E.coli* produit une céphalosporinase chromosomique naturelle à très bas niveau, non inductible de type AmpC, qui peut conférer à certaines souches une résistance aux aminopénicillines, à leur association au clavulanate et aux céphalosporines de première génération C1G [89]. Les souches sauvages restent donc le plus souvent sensibles à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines. Cependant, l'hyperproduction de cette enzyme AmpC provoque une résistance à plusieurs  $\beta$ -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les céphalosporines de troisième génération C3G, l'aztréonam et aux combinaisons des pénicillines avec les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Par contre les céphalosporines de quatrième génération C4G (céfépime, cefpirome) et les carbapénèmes gardent leur effet sur les souches produisant ces enzymes. Depuis 2004, de nouvelles  $\beta$ -lactamases AmpC à spectre étendu ont été décrites chez des souches cliniques d'*E.coli*. Il s'agit d'enzymes dérivées de céphalosporinases chromosomiques capables d'inhiber les céphalosporines de quatrième génération C4G (céfépime, cefpirome) [90, 91].

#### B)- céphalosporinases plasmidiques

Les céphalosporinases plasmidiques sont des  $\beta$ -lactamases de la classe C, avec un phénotype de résistance qui est similaire à celui des céphalosporinases hyperproduites qui se traduit généralement par une résistance aux C3G, associé avec une résistance à l'acide clavulanique et souvent à la céfoxitine, à l'exception de l'imipénème. Il s'agit d'un phénotype retrouvé chez les bactéries possédant naturellement une céphalosporinase AmpC qui peut être surexprimée. Des différences au niveau de leurs séquences en acides aminés ont permis de les classer en plusieurs familles : CMY, ACT, ACC, DHA, FOX, MOX, LAT, MIR et CFE. [92, 93].

#### C)- Béta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

- **Définition**

les BLSE sont définies comme des  $\beta$ -lactamases appartenant à la classe A ou D (BLSE de type OXA) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et les monobactames (l'aztréonam). Par contre, les céphamycines (ex. céfoxitine, céfotétan) et les carbapénèmes (ex. imipénème) restent actifs. Les BLSE de classe A sont

inhibées *in vitro* par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam). Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est possible le plus souvent. Les bactéries productrices des BLSE sont appelées multirésistantes [94, 95].

- **Types de BLSE**

La classification de ces enzymes est basée sur leurs séquences en acides aminés, et elles sont en général portées par des plasmides et des transposons, ce qui explique la rapidité de leur diffusion. Elles sont classées en 12 familles différentes: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, IBC, BEL et OXA (enzyme appartenant à la classe D) et les plus fréquents étant les types TEM, SHV, CTX-M [96, 97].

- Les BLSE de type TEM, SHV

Les BLSE de type TEM ont été isolées en 1965 à partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination. Ces enzymes dérivent par mutation ponctuelle des pénicillinases originales (TEM-1 ou TEM-2) (Figure 06) [98].

Les BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *blaSHV* de pénicillinase chromosomique transposé sur un plasmide. Ce type de BLSE est détecté chez une souche de *K. pneumoniae* et cette désignation SHV est liée au sulfhydryl variable (Figure 07) [99].

La nature des mutations détermine le spectre d'action de l'enzyme. Ces BLSE (TEM et SHV) confèrent la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), au céfépime et à l'aztréonam. Elles sont classées en deux grands groupes: les ceftazidimases qui confèrent un plus haut niveau de résistance à la ceftazidime qu'au céfotaxime (ex : TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5) et les céfotaximases qui confèrent un niveau de résistance équivalent à ces deux molécules (ex : TEM-3, SHV-2). Ces BLSE appartiennent à la classe moléculaire A et sont détectées par la mise en évidence d'une synergie dite en « bouchon de champagne » entre l'acide clavulanique et les C3G, sauf les céfamycines et les carbapénèmes restent stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les BLSE [100].

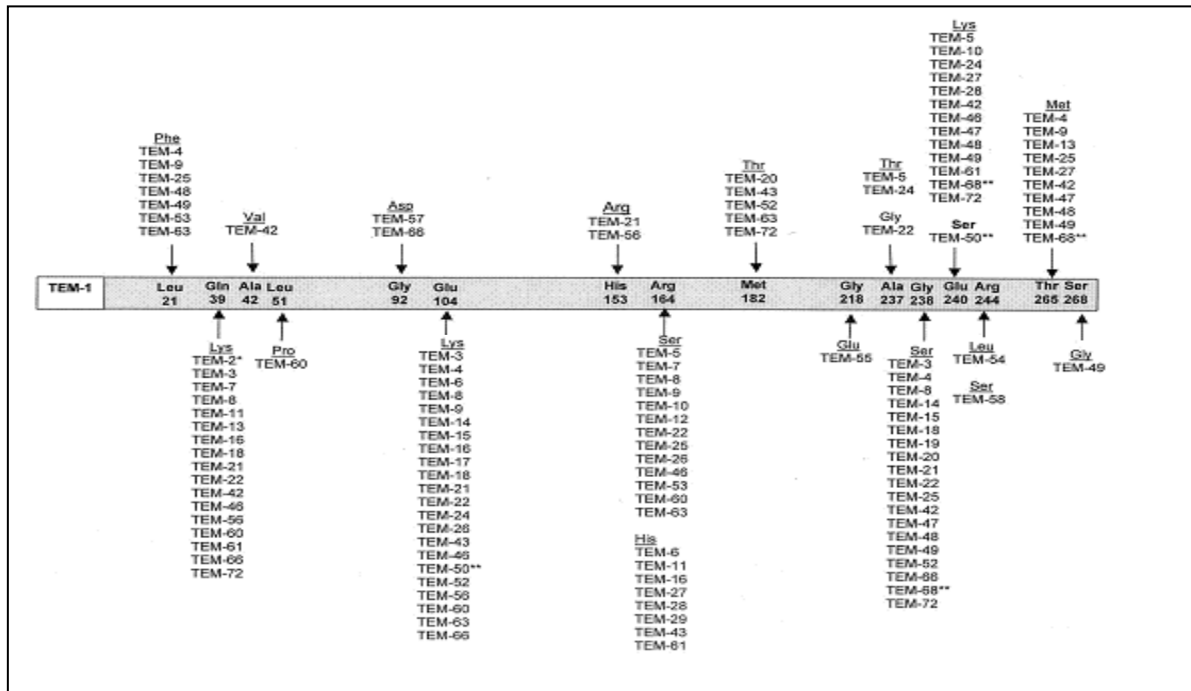


Figure 06: Les BLSE dérivées de TEM [101]

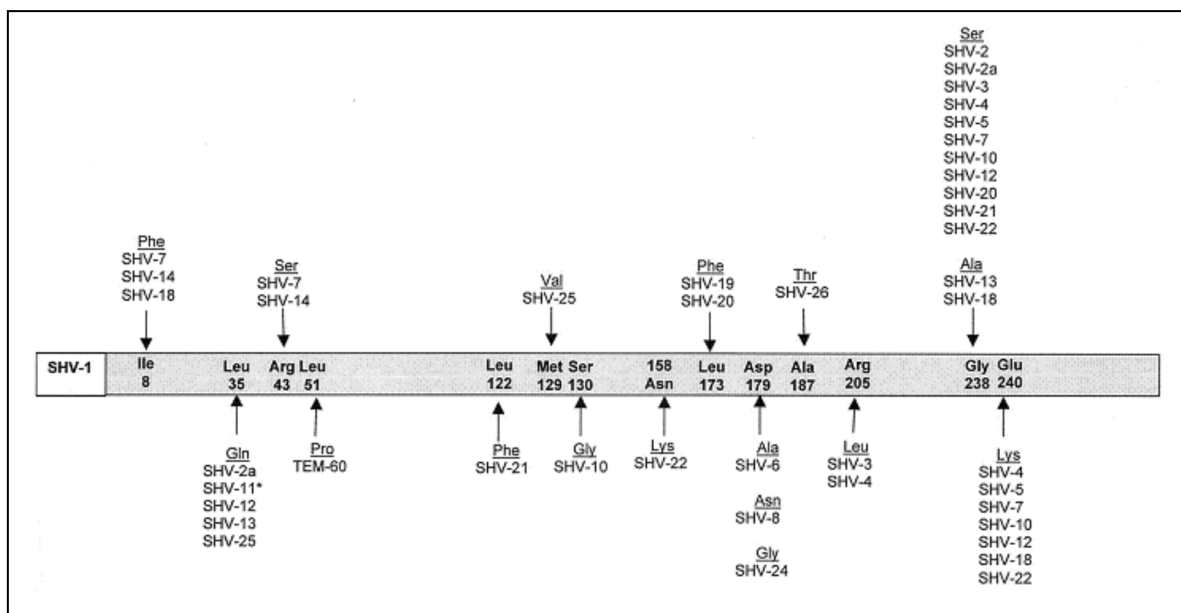


Figure 07: Les BLSE dérivées de SHV [102].

➤ Les BLSE de type CTX-M

Ce Type de BLSE a été identifié chez une souche d'*E. coli* isolée en Allemagne à Munich et chez une souche de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolée en Argentine. Cette enzyme appartenant à la classe A d'Ambler a été dénommée CTX-M pour

«cefotaximase Munich ». Plusieurs variants CTX-M ont été décrits et ont été classés en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1 avec M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ; le groupe CTX-M-2 avec M-4, 5, 6, 7, 20, et Toho-1 ; le groupe CTX-M-8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ; le groupe CTX-M-9, avec M-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27, le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45. Cette classification a été réalisée en fonction des similitudes de leurs séquences en acides aminés. Ces enzymes dont Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, présentent un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime, à l'exception des enzymes CTX-M-15, M-16, M-19, M-23, M-27 et M-32 qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique [103, 104, 66].

➤ Les autres types de BLSE

D'autres BLSE ont une distribution moins large que celle du groupe CTX-M, et sont caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime. Ce groupe regroupe les BES-1 (*brazilian extended spectrum*), GES-1 (*Guyana extended spectrum*), PER-1 (*Pseudomonas extended resistance*), SFO-1 (*Serratia fonticola*), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine), et VEB-1 (*Vietnam extended spectrum*). Des enzymes proches de GES-1 ont été découvertes en Grèce, malheureusement dénommées à tort IBC (*integron borne cephalosporinase*) (IBC-1, IBC-2). Enfin, l'OXA-1 qui a une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline [105, 106, 107].

## D)- Les Carbapénèmases

La résistance aux carbapénèmes est liée à deux mécanismes impliquant des  $\beta$ -lactamases. Le premier est lié à l'association de la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE avec une diminution de perméabilité membranaire par perte ou altération de porines et se traduit par une diminution de l'activité de plusieurs  $\beta$ -lactamines y compris l'imipénème. Le second mécanisme met en jeu l'apparition de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes, nommées carbapénèmases [108]. La première carbapénémase produite par des entérobactéries a été identifiée en 1993. Ensuite, plusieurs carbapénèmases ont été rapportées appartenant à trois classes moléculaires d'Ambler : les classes A, B et D [109]. La classe A comprend notamment les enzymes de type

KPC, la classe B regroupe les métallo- $\beta$ -lactamases comme VIM ou IMP ou plus récemment NDM-1 et enfin la classe D comprend des enzymes comme OXA-48.

#### **4. *E. coli* et Aminocyclitolides**

Le traitement des infections graves à bacilles à Gram négatif nécessite l'utilisation des aminocyclitolides le plus souvent en association avec une  $\beta$ -lactamine ou une fluoroquinolone. Les aminocyclitolides ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif.

##### **4.1. Mécanismes de résistance aux Aminocyclitolides**

Les mécanismes généraux de résistance aux aminocyclitolides sont :

###### **4.1.1. Modification enzymatique de l'antibiotique**

La modification enzymatique de l'antibiotique est le mécanisme de résistance aux aminocyclitolides le plus courant chez les entérobactéries. Lorsqu'un aminocyclitolide est modifié par des enzymes bactériennes sa fixation sur l'ARN 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité [110]. Ces enzymes catalysent les réactions suivantes :

- Acétylation d'un groupement aminé [N- acétyltransférase (AAC)].
- Phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O- phosphotransférase (APH)].
- Nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférase (ANT)].

###### **4.1.2. Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique**

C'est un mécanisme non enzymatique, il s'agit de la diminution de la concentration intra-cytoplasmique en aminocyclitolides qui est due généralement à une exportation active de l'antibiotique par des pompes d'efflux qui expulsent les aminocyclitolides vers le milieu extérieur en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique et entraînent une résistance à cette famille d'antibiotiques [111].

###### **4.1.3. La méthylation de l'ARN 16S**

Il s'agit de la méthylation des nucléotides spécifiques, situés au niveau du site A de l'ARNr 16S, site de liaison des aminocyclitolides sur le ribosome, ce qui empêche la liaison de ces antibiotiques à la sous-unité 30S ribosomale. Ce mécanisme confère une résistance de haut niveau à tous les aminocyclitolides cliniquement importants (amikacine, gentamicine, kanamycine, nétilmycine et tobramycine). Cette méthylation de l'ARNr 16S a été rapportée chez les



---

bactéries pathogènes pour l'homme. Le premier gène codant une méthylase de l'ARNr 16S, nommé *armA*, a été identifié En 2003 chez une souche de *K. pneumoniae*. Depuis, onze déterminants de ces enzymes ont été décrits (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtE2*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA*) avec prédominance du genre *armA* et *rmtB* [112, 113, 114].

**Deuxième partie**

# **Matériel et Méthodes**

## 1. Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine qui est un centre hospitalier régional situé dans l'est algérien et qui date de l'époque coloniale.

L'objectif principal de notre étude est la caractérisation des gènes AmpC et l'étude de la coexistence des gènes de l'ARNr16S méthylases et des carbapénémases dans des souches d'*Escherichia coli* productrices des BLSE isolées de patients hospitalisés dans différents services du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine (CHUC), ainsi que des sujets non hospitalisés venus en consultation externe, sur une période qui s'est étendue sur environ 18 mois. Au cours de cette étude nous avons fait appel aux méthodes phénotypiques puis moléculaires d'isolement et d'identification des souches d'*Escherichia coli* ensuite la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et enfin nous avons eu recours à diverses techniques de Biologie Moléculaire telles que la PCR, le séquençage pour la détermination et la caractérisation moléculaire des gènes de résistance ainsi qu'à des expériences de conjugaison bactérienne. Il est à noter que l'analyse bactériologique a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHUC. Les techniques de Biologie Moléculaire ont été menées en partenariat avec le centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique.

## 2. Prélèvements et souches bactériennes

Notre étude a porté sur 180 souches non répétitives d'*Escherichia coli* issues de prélèvements cliniques à visée diagnostique de patients hospitalisés dans différents services du CHU de la ville de Constantine et de patients non hospitalisés venus en consultation externe, ont été recueillies. Les prélèvements provenant de différents sites de colonisation pathologiques (urine, pus,...etc) ont été effectués selon la technique appropriée à chaque prélèvement.

### 3. Isolement et purification des souches

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface du milieu contenant la gélose Hektoen pour l'isolement des entérobactéries. Après un examen morphologique, les différentes colonies obtenues présentant les caractéristiques morphologiques d'*Escherichia coli* (des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre) ont été sélectionnées puis ré-isolées sur le même milieu Hektoen et incubées pendant 24 heures à 37°C afin d'obtenir des souches pures qui ont été conservées pour plusieurs semaines (Figure 08).



Figure 08 : Conservation des souches d'*Escherichia coli*

### 4. Identification des isolats

L'identification des isolats a été réalisée en se basant sur plusieurs tests : détermination de leurs caractères morphologiques ; coloration de Gram (annexe1), culturaux, et biochimiques. Selon les méthodes classiques en usage au laboratoire, à savoir par les galeries biochimiques classiques , puis confirmées par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry). (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) [115].

## 4.1. Tests préliminaires

### ➤ Examen macroscopique

L'examen de l'aspect macroscopique des colonies sert à orienter le diagnostic, il permet d'effectuer une première caractérisation, il consiste en une observation des colonies en mentionnant l'aspect des colonies, la forme, la couleur, la consistance, la Surface, l'odeur et la taille de ces dernières. La mise en culture nécessite l'utilisation de milieux spécifiques tels que la gélose d'Hektoen.

#### ▪ Gélose Hektoen

C'est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries à partir des prélèvements biologiques. Le principe de base de ce milieu repose sur l'inhibition de la flore à Gram positif qui est due à la présence de sels biliaires qui peuvent aussi inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif.

#### ▪ Mode opératoire

L'ensemencement de l'inoculum se fait en stries à la surface des boîtes préparées à température ambiante, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

#### ▪ Lecture

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des trois glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les bactéries qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les bactéries productrices de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir.

### ➤ Examen microscopique

La coloration de Gram est la coloration de base en bactériologie, elle permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries, leurs morphologies, et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure en se basant sur les propriétés biochimiques de leur paroi. Les étapes de coloration de Gram sont détaillées dans l'annexe 01. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries Gram négatif sont roses.

## 4.2. Tests biochimiques

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques. Les souches ayant donné des caractéristiques de culture identiques aux souches d'*E. coli* ont été soumises à une série de tests biochimiques pour l'identification des souches d'*E. coli* avant de procéder à l'analyse moléculaire.

Les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, ils permettent en général de distinguer les espèces et sous espèces de bactéries. Ces tests ont été réalisés en utilisant les galeries biochimiques traditionnelles : Le milieu TSI (milieu triple sucres), Mannitol-Mobilité, Clark et Lubs, Citrate de Simmons, et milieu Urée-Indole.

### 4.2.1. Préparation de la suspension bactérienne

La préparation de la suspension bactérienne a été effectuée en condition aseptique en introduisant une colonie bien isolée dans un tube d'eau physiologique stérile. Cette suspension sert à ensemercer différents milieux de culture en tube permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques d'*Escherichia coli*.

### 4.2.2. Galeries classiques

Ces galeries comportent les tests suivants :

➤ **Gélose T.S.I** (Triple Sugar Iron agar)

Milieu solide gélosé, incliné, renfermant un indicateur de pH coloré, le rouge de phénol, il contient trois sucres (glucose avec une forte concentration au culot- saccharose et lactose au niveau de la pente), des peptones, des thiosulfates et du fer. cette gélose permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de trois caractéristiques : la fermentation du glucose, l'utilisation ou non du lactose et du saccharose, et aussi la mise en évidence de la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).

L'ensemencement a été effectué par pique centrale dans le culot et la pente par des stries serrées à l'aide de la pipette pasteur, puis incubation à 37C° pendant 24h.

La fermentation du glucose se manifeste par le virage au jaune du culot, et la production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose ou le décollement

de celle-ci. - La fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente, et la production de H<sub>2</sub>S se traduit par le noircissement du milieu.

➤ **Milieu mannitol-mobilité**

Le mannitol-mobilité est un milieu semi solide qui permet la différenciation rapide des entérobactéries, en recherchant la mobilité, la dégradation du mannitol. Ce milieu est utilisé seulement pour les bactéries fermentatives.

Un ensemencement a été effectué par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur, et incubation à 37°C pendant 24 h.

Le virage du milieu rouge au jaune signifie la fermentation du mannitol. Pour La mobilité, elle se traduit par l'envahissement de la gélose molle, l'observation d'une culture dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans tout le milieu (bactérie mobile) mais lorsqu'il y a culture uniquement au niveau de la piqure centrale cela signifie que la bactérie est immobile.

➤ **Milieu au citrate de sodium (milieu de Simmons)**

Le milieu citrate de sodium (simmons) est un milieu solide gélosé incliné qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier d'après l'utilisation ou non du citrate comme seule source de carbone. Le principe est de placer les germes dans un milieu contenant une seule source de carbone, le Citrate. Seules les bactéries qui possèdent les enzymes de dégradation de cette molécule peuvent se développées dans ce milieu.

Le milieu est ensemencé par des stries le long de la surface de la pente à l'aide de la pipette pasteur, puis incubation pendant 24h à 37°C.

L'utilisation du citrate de sodium se traduit par le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu, ce qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une enzyme citrate perméase (citrate+).

➤ **Milieu urée-indole**

Le milieu urée-indole est un milieu complexe qui fournit un ensemble d'informations utiles pour la différenciation des entérobactéries, il permet de mettre en évidence chez les

entérobactéries la présence d'une uréase, d'une tryptophane-désaminase (TDA), d'une tryptophanase, ainsi que la production d'indole. Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

Le milieu contient du L-tryptophane et sa dégradation par les bactéries possédant une tryptophanase s'accompagne d'une production d'indole, révélée au moyen du réactif de Kovacs : en cas de réaction indole positive, un anneau rouge apparaît en surface du bouillon. Sinon sa dégradation par les bactéries possédant une tryptophane-désaminase s'accompagne d'une production d'acide indole-pyruvique révélée au moyen d'une solution de perchlorure de fer par l'apparition d'un précipité brun noir.

Ce milieu est ensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 h. Après incubation 2 à 3 gouttes de réactifs de Kovacs ont été rajoutées. La lecture est immédiate.

### **4.3. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex)**

#### **4.3.1. Principe**

La spectrométrie de masse est une technique d'identification des bactéries utilisée en microbiologie clinique, elle est basée sur le profil protéique des bactéries isolées qui permet en quelques minutes et avec une haute précision l'identification des micro-organismes par l'analyse de leurs protéines totales [116].

Le spectromètre est composé de trois éléments principaux : une chambre d'ionisation, un analyseur séparant les ions selon le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et un détecteur transformant le courant ionique en courant électrique et générant un spectre de masse caractérisant l'échantillon. Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre où l'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame, le dépôt ainsi formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon (MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*). Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur (TOF = *Time-Of-Flight*). Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur



qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre. Le spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne.

#### 4.3.2. Méthode de réalisation

Cette technique est réalisée au niveau du laboratoire du centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique. Le protocole appliqué pour identifier les souches bactériennes, collectées selon cette technique est le suivant :

- **Nettoyage de la plaque cible**

Consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude, puis à verser de l'éthanol à 70% que l'on frotte avec du papier. La cible est ensuite plongée dans l'éthanol pendant 15 min, puis on la frotte avec 500 µL de TFA (Acide TriFluoroacétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC (High-performance liquid chromatography). Cette dernière est, enfin, laissée sécher à l'air libre.

- **Préparation de la matrice**

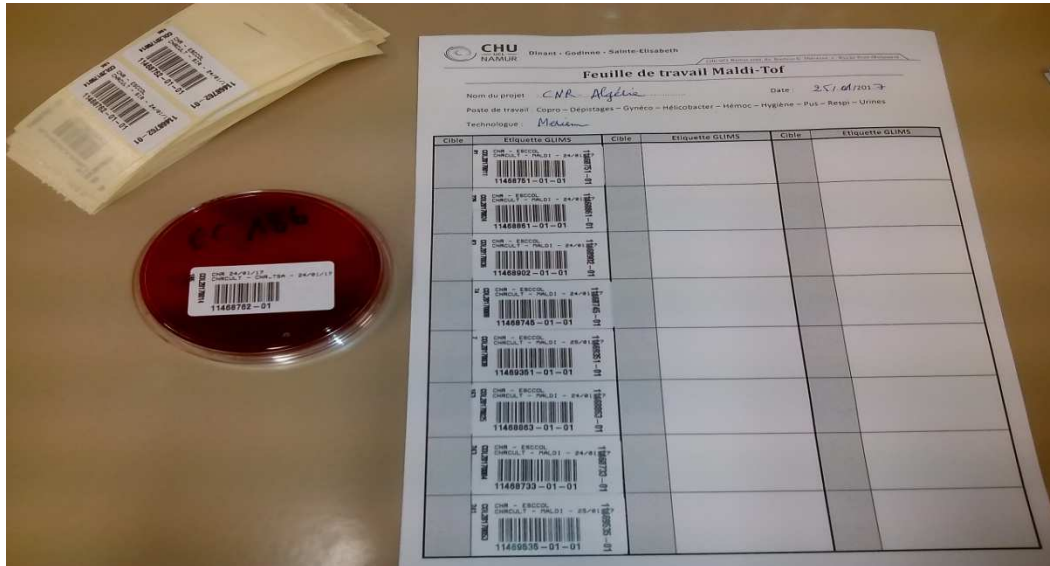
Une matrice solide est utilisée comme véhicule pour la substance à analyser à l'aide de laser pour l'analyse MALDI. La matrice permet de protéger l'échantillon d'une ionisation directe, elle permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident.

Dans ce travail, nous avons utilisé, sous une hotte chimique, un protocole de préparation de la matrice. Dans un tube Eppendorf, on dispose ces éléments en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules de la matrice (typiquement d'alpha- cyano-4-hydrocinnamic acide, HCCA).
- 500 µL d'acétonitril HPLC.
- 250 µL de TFA à 10% (acide trifluoroacétique).
- 250 µL d'eau HPLC.
- La solution est agitée, soniquée pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM.
- Transférer le surnageant dans un tube d'Eppendorf propre. Ainsi la matrice est prête à l'emploi.

- **Dépôt des échantillons**

Sous un PSM (poste de sécurité microbiologique), nous avons complété dans un premier temps le plan de la cible MALDI utilisée en indiquant la référence des échantillons déposés (Figure 09).



**Figure 09** : Plan de la cible MALDI-TOF

Une seule colonie pour chaque souche bactérienne, a été prélevée à partir d'une culture pure de 24h, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm<sup>2</sup> sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser (support métalliques en acier inoxydable avec 96 puits à l'aide d'une pointe de cône). Afin de réduire le risque d'erreur, 4 spots ont été réalisés pour chaque souche.

Des témoins positifs et négatifs ont été utilisés. Après séchage sous hotte pendant 5 min, 2 $\mu$ L de matrice cyanohydroxycinnamique ont été ajoutés sur chaque spot. Une seconde étape de séchage sous hotte permettait sa cocristallisation avec l'échantillon bactérien, sans oublier de ranger la cible MALDI dans sa boîte plastique (Figure 10).



**Figure 10** : La plaque métallique MALDI-TOF après dépôt des échantillons

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

La plaque cible est ensuite introduite dans le Microflex (Microflex LT3, Sy004510, Bruker Daltonics, Wissembourg, Allemagne) et exposée, sous-vide, aux tirs du laser après remplissage de la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control et lancement de spectromètre de masse : Microflex.

- **Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique**

Le MALDI-TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics). Cette identification étant basée sur la comparaison de la position, la fréquence et l'intensité des pics du spectre de masse inconnu avec tous les spectres typiques enregistrés dans la banque de données d'empreintes spectrales de souches de référence. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un micro-organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent chez tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le modèle respectif à une base de données étendue, ouverte, pour identifier le micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. Le résultat d'identification par MALDI-TOF est donné avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois. On considère qu'une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9.

## 5. Etude de l'antibiorésistance des souches

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu solide (Antibiogramme) au niveau du laboratoire de bactériologie au CHU de Constantine ensuite la technique a été refaite dans le laboratoire du centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique et les antibiogrammes ont été effectués selon les normes CLSI 2012 sur gélose Mueller-Hinton (MH) (Bio-Rad Laboratories) et les antibiotiques (Bio-Rad Laboratories) testés étaient les suivants (Tableau 03):

**Tableau 03 :** Antibiotiques testés vis-à-vis des souches d'*E. coli*

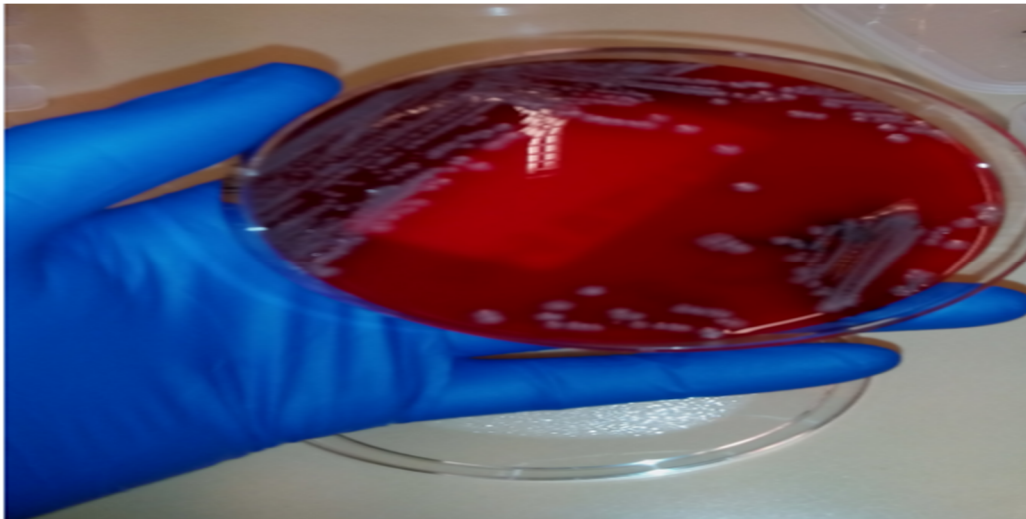
<b>Familles des antibiotiques</b>	<b>Antibiotiques testés</b>
<b>Béta-lactames</b>	Aztréonam, Amoxicilline/Clavulanate, Ampicilline, Cefotaxime, Cefuroxime, Ceftazidime, Cefepime, Pipéracilline/Tazobactam, Témocilline, Cefoxitine Ertapénem, Meropénem
<b>Quinolones</b>	Ciprofloxacine
<b>Aminosides</b>	Amikacine Gentamicine

### 5.1. Réalisation de l'antibiogramme

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié (TSA) (Figure 11) une suspension en 5 ml de solution saline eau physiologique (0,9 % NaCl) a été préparée

équivalente au standard 0,5 McFarland. Ensuite, les géloses MH ont étéensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir de cette suspension. Des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses, à l'aide d'un distributeur automatique, cette étape suivie d'une incubation pendant 18-24h à 37°C (Figure 12).

La lecture a été faite par la mesure avec précision des différents diamètres des zones d'inhibition, en comparant ces résultats avec les diamètres critiques selon les critères définis par les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance. Dans notre travail, la souche de référence étudiée est: *E.coli* ATCC 25922 souche sensible, utilisée pour contrôler les paramètres de conformité (conformité des résultats).



**Figure 11 :** Culture pure d'*E. coli* sur milieu TSA



**Figure 12 :** Exemple d'antibiogramme réalisé pour l'étude du profil de résistance

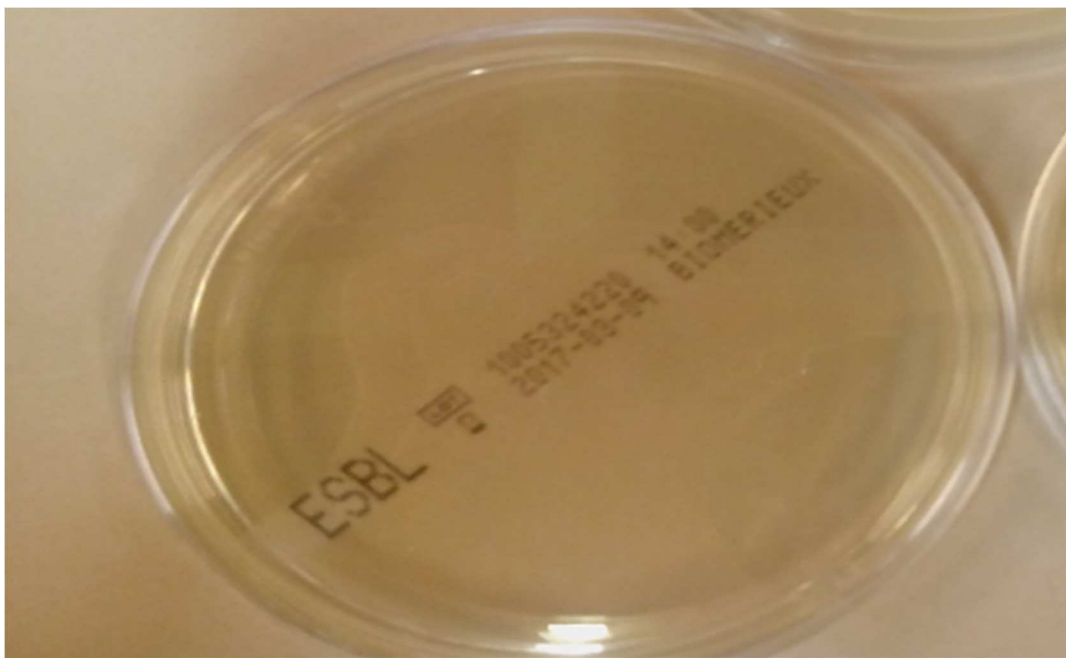
## 6. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques

### 6.1. Recherche phénotypique de la production des BLSE

Cette recherche a été effectuée par deux méthodes :

#### 6.1.1. Milieu chromogène ESBL (Biomérieux)

Les milieux chromogènes sont très utilisés en microbiologie pour la mise en évidence d'activités enzymatiques par l'apparition d'une coloration spécifique. Le milieu ESBL fait partie de la gamme intelligente des médias de bioMérieux, c'est un milieu chromogène développé pour le dépistage des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu afin de relever le défi des bactéries multirésistantes (Figure 13).



**Figure 13 :** Milieu chromogène ESBL (Biomérieux).

Ce milieu assure l'isolement direct et l'identification fiable et rapide de ces bactéries productrices de BLSE. Il est composé d'une base nutritive (agar) additionnée d'un mélange d'antibiotiques dont le céfpodoxime, qui est le marqueur de choix pour ce mécanisme de résistance. Grâce à l'introduction de substrats chromogènes, ces milieux combinent l'isolement et l'identification des micro-organismes cibles en une seule étape, ce qui permet un gain de temps et de réactifs par la réduction du nombre de confirmations inutiles et d'avoir une réponse rapide en 18 à 24 h pour l'isolement des patients à risque dans les services sensibles. Ce mélange est conçu spécifiquement pour permettre la croissance sélective des entérobactéries productrices de BLSE. Des substrats chromogéniques non colorés sont

également incorporés dans le milieu gélosé, ces substrats sont absorbés par l'espèce bactérienne et produisent ainsi une substance colorée (métabolite) caractéristique de cette espèce. Ce métabolite coloré reste dans les cellules bactériennes, ce qui conduit à la production de colonies bactériennes colorées, visibles à l'œil nu permettant une identification directe de la bactérie [117].

Les milieux chromogéniques sont d'une grande simplicité d'utilisation : il suffit d'observer la couleur des cultures et de noter le résultat. Le substrat chromogène contenu dans chaque milieu spécifique permet de distinguer chaque type de colonie par couleur ; les colonies d'*Escherichia coli* productrices de BLSE se distinguent par une couleur rose à bordeaux sur le milieu ESBL (Biomérieux).

- **Méthode de réalisation**

Sous PSM :

- Prélever une colonie d'une culture jeune de la souche à tester.
- Inoculer le milieu ESBL (Biomérieux) par stries.
- Incuber 18 à 24h à 37°C.

- **Lecture et interprétation des résultats**

- L'absence d'une culture désigne une bactérie BLSE – (négatif)
- La présence d'une culture rose à bordeaux désigne une souche *E. coli* BLSE + (positif).

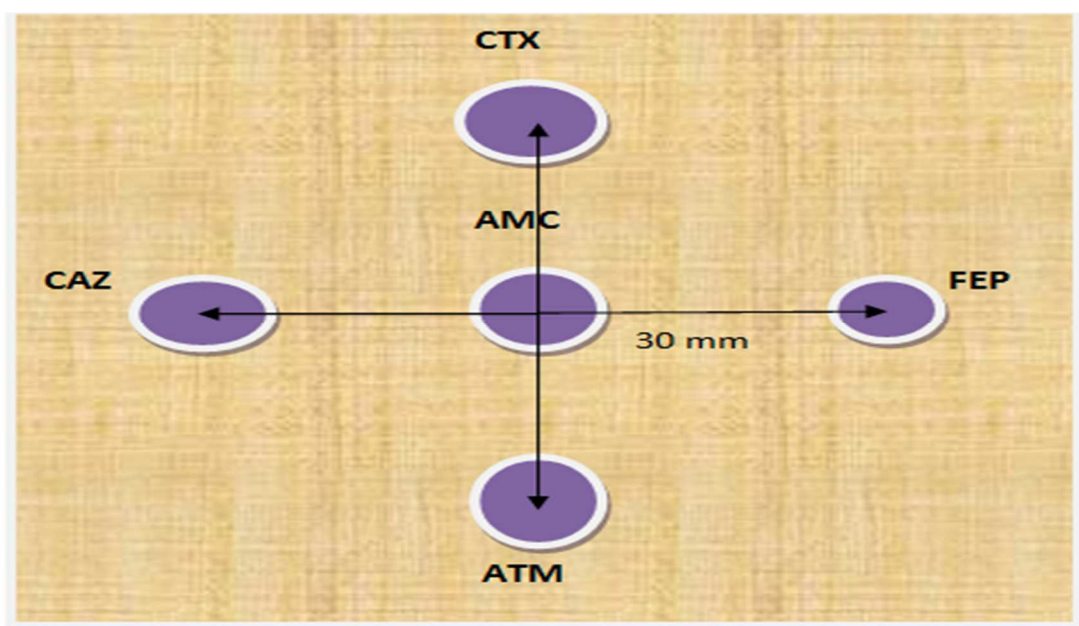
### **6.1.2. Test de synergie**

La production d'une BLSE a été recherchée à l'aide de test de synergie réalisé sur gélose Mueller-Hinton. Le test de synergie permet la détection de BLSE chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque central d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (amoxicilline-acide clavulanique AMC), et les disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) (céfotaxime CTX, ceftazidime CAZ) et céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération (C4G) (FEP céfépime) et l'aztréonam (ATM). Cette image dite en "bouchon de champagne". La présence d'une BLSE a été caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique [118].



- **Méthode de réalisation**

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon les conditions standard de la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivants: l'amoxicilline-ac-clavulanique (AMC), la ceftazidime (CAZ), la céfotaxime (CTX), la céfépime (FEP) et l'aztréonam (ATM) sont placés sur la gélose Mueller Hinton selon le schéma ci-dessous (Figure 14). La distance entre deux disques est de 20 ou 30 mm centre à centre. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24h à 37°C.



**Figure 14 :** Disposition des disques d'antibiotiques et détection de la production des BLSE par le test de synergie

- **Lecture et interprétation des résultats**

Après incubation, le résultat est décrété positif si on assiste à une image caractéristique « bouchon de champagne » entre les disques d'antibiotiques utilisés, ce qui indique une production de BLSE.

## 6.2. Détection phénotypique de la production des céphalosporinases et des méthylases de l'ARNr 16S

Tous les isolats de cette collection résistants à la céfoxitine selon les normes du CLSI, ont été sélectionnés pour le dépistage des gènes AmpC.



Les résultats de l'antibiogramme des bactéries étudiées qui montraient une résistance des souches aux antibiotiques de la famille des aminosides ont induit la recherche de la production des méthylases de l'ARNr 16S en détectant les gènes impliqués dans leur biosynthèse.

### **6.3. Détection phénotypique de la production des carbapénémases**

Les carbapénèmes sont utilisés en général en dernier recours pour soigner les infections bactériennes. Cependant, des souches de bactéries résistantes aux carbapénèmes émergent rapidement, en particulier chez les entérobactéries. La recherche des carbapénémases par les tests phénotypiques est réalisée sur les souches présentant une résistance à l'imipénème ou à l'ertapénème. Nous nous sommes intéressés particulièrement à ces antibiotiques, car la prescription des carbapénèmes devient de plus en plus fréquente, dans le cas des infections dues aux bactéries productrices de BLSE, mais également en traitement probabiliste en cas d'infection nosocomiale sévère.

#### **6.3.1. Test CARBA NP modifié colorimétrique**

Le test CARBA NP modifié est un test rapide pour la détection des bactéries productrices de carbapénémases. Dans notre étude ce dosage est basé sur l'hydrolyse de l'ertapénème avec un changement de couleur de l'indicateur de pH phénolique du rouge à l'orange/jaune (résultat positif) [119]. Nous avons utilisé le protocole du Carba NP test modifié selon Bakour *et al.* 2015 qui consiste à :

- **Préparation de la solution A**

Nous avons préparé une solution concentrée de rouge phénol 0.5% (0.5 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée), puis un mélange de 2 ml de la solution concentrée de rouge phénol dans 16.6 ml d'eau distillée a été préparé, ensuite nous avons ajouté 180 µL d'une solution de ZnSO<sub>4</sub> 10 mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO<sub>4</sub> à 0.1 mM et avons ajusté le pH à 7.5 avec une solution de NaOH (1N).

- **Protocole**

Dans un tube Eppendorf, nous avons mis 200 µL de tampon de lyse (CTAB 0.02%) inoculé par la bactérie à tester en utilisant une boucle d'inoculation de (10 µL) de colonies bactériennes suivi d'une agitation au vortex (1 à 2 min). Puis nous avons transféré la suspension bactérienne dans 2 tubes Eppendorf (A) et (B) avec 100 µL dans chaque tube. 100 µL de la solution A ont été ajoutés dans le tube Eppendorf (A) puis 100 µL de la solution A + Carbapénème : imipénème ou ertapénème dans le tube Eppendorf (B). Après, nous

avons mis les deux tubes préparés sous agitation au vortex pendant 5 seconds pour procéder par la suite à une incubation à 37°C pendant un maximum de 2 heures. La lecture visuelle de la couleur dans chaque tube Eppendorf.

### 6.3.2. Test Phénotypique à la témocilline

Afin de pouvoir détecter également les carbapénémases de type OXA-48, la sensibilité à la témocilline a été testée. En effet, la grande majorité des souches produisant une carbapénémase de type OXA-48 (98.2%) sont très résistantes à la témocilline. La résistance à la témocilline possède une bonne valeur prédictive positive pour la détection des carbapénémases de type OXA-48 [120].

### 6.3.3. Test de Hodge modifié

Le test Hodge (HT) est très utilisé comme méthode phénotypique générale qui permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre souches productrices de carbapénémases (souches à tester) et souche sauvage de référence sensible. Ce test consistait à ensemercer le milieu Mueller Hinton à l'aide d'un écouvillon d'une suspension de Densité Optique (DO) = 0.5 Mc Farland de la souche *E. coli* ATCC 25922 (souche sensible aux antibiotiques actifs sur les BGN). Ensuite, un disque d'ertapénème chargé à 10 µg a été déposé au centre de la boîte, et une colonie de chaque souche testée (EC1 EC2) est ensemençée de manière radicale à partir du disque jusqu'au bord de la boîte de pétri. Après incubation pendant 18 à 24 h à 37°C, la présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif et indique la présence d'une carbapénémase [121].

### 6.3.4. Test à EDTA-ETP (Disques combinés) (détection des métallo-β-lactamases)

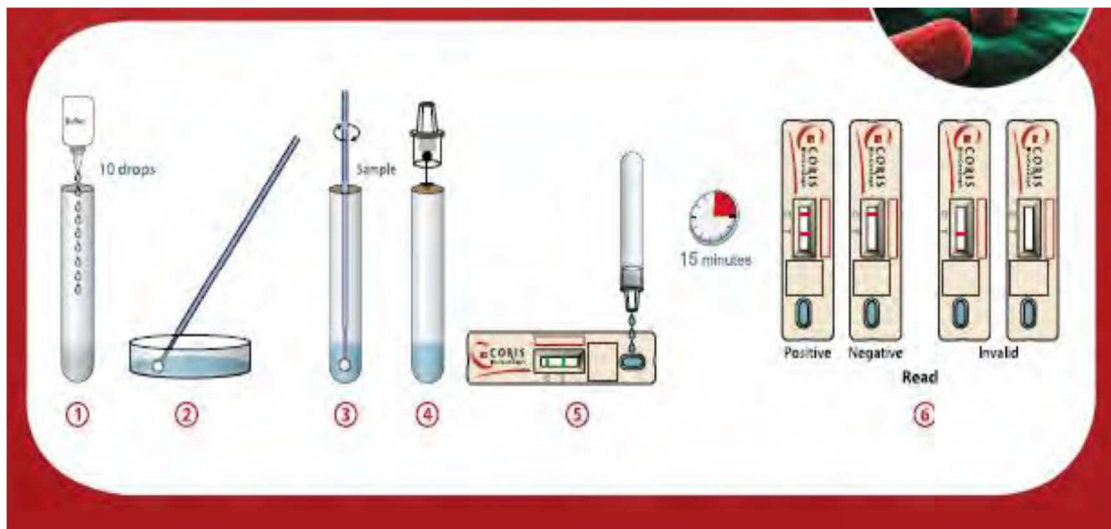
Ce test consiste à ensemercer, à l'aide d'un écouvillon, une suspension (de 0.5 Mc Farland de densité optique) des souches à tester sur une gélose Mueller Hinton comme pour la réalisation d'un antibiogramme selon les recommandations du CA-SFM. Afin de détecter les métallo-β-lactamases. Deux disques d'ertapénème (10µg) dont l'un additionné de 5µl d'EDTA (solution 0.5M, pH8) étaient placés à une distance de 4cm environ (centre à centre) l'un de l'autre. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés. Les souches dont le diamètre d'inhibition, autour du disque ETP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque de l'ETP seul d'au moins 7mm, sont considérées comme productrices de métallo-β-lactamases [122].

### 6.3.5. Test immunochromatographiques pour la détection des carbapénèmases de type OXA-48 (K-Set-OXA-48)

Ce test permet la mise en évidence rapide d'une carbapénémase de type OXA-48 directement à partir d'une colonie bactérienne ayant poussée sur n'importe quel milieu de culture y compris les milieux de screening.

- **Réalisation du test Coris Bioconcept** (Figure 15) [123]

- 1- introduire 10 gouttes de tampon dans un tube
- 2- ajouter la colonie bactérienne
- 3- homogénéiser la solution
- 4- ajouter le capuchon compte-goutte sur le tube
- 5- déposer 3 gouttes de solution dans la fenêtre de la cassette
- 6- attendre 15 minutes et lire le résultat :
  - résultat positif : bande contrôle (C) + bande test (T)
  - résultat négatif : bande (C) seule
  - résultat invalide : bande (C) absente (avec ou sans bande test).



**Figure 15 :** Étapes de réalisation du test Coris Bioconcept [123]

## 7. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques

Nous avons utilisé la technique de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction PCR) multiplexe en point final pour la détermination des gènes responsables de la multirésistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli*. La PCR multiplexe est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois

amorces par réaction de PCR. La PCR multiplexe peut se faire en point final dont les produits de PCR étant usuellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction.

### 7.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite selon la méthode décrite par Bogaerts *et al.*, 2013 en utilisant la méthode de lyse à ébullition. Une colonie de la bactérie à analyser a été introduite dans 200 µl d'eau distillée en présence de 10 µl de la suspension de la souche d'*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 qui a été ajoutée à la suspension avant extraction comme contrôle d'extraction interne. Le mélange est bouilli à (95°C pendant 10 min dans un bain sec) et centrifugé à 13000 tours/min pendant 10 min. le surnageant, contenant l'ADN bactérien a été récupéré pour le test d'amplification par PCR [124].

### 7.2. Amplification de l'ADN par PCR Multiplexe en point final (end-point multiplex PCR)

Le dépistage des gènes codant pour les BLSE conventionnels (TEM, SHV, CTX-M), les gènes codant pour les céphalosporinase AmpC (CMY, FOX, ACC, MIR, ACT, MOX, DHA), les gènes codant pour les carbapénémases (VIM, KPC, IMP, NDM, OXA-48) et les gènes codant pour les méthylases de l'ARNr 16S (armA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, npmA) a été réalisé par la technique de PCR multiplexe en point final comme il a été décrit précédemment par Bogaerts *et al.*, 2013 [124]. Les mélanges réactionnels ont été préparés comme décrit ci-dessous et les PCR ont été réalisées dans les conditions d'amplification suivantes (Tableaux 4, 5, 6, 7, 8) :

**Tableau 04:** PCR multiplexe des gènes (TEM, SHV).

	<b>Amplicon</b>	<b>pb</b>	<b>Souches contôles</b>	
	SHV	234	KLPN 700603	
	OXA-1/30	391	E. cloacae 939	
	TEM	503	E. cloacae 939	
	ADC (CI)	1059	ATCC 19606 ( <i>A. baumannii</i> )	
<b>Conditions amplification:</b>	<b>programme QIAGEN 57 ISO</b>		<b>Préparation du mix PCR</b>	
	15min à 95°C	1X	Nbre éch	4
	30 sec à 94°C	30X	Nbre de ctrl +	1
	90 sec à 57°C		Nbre de ctrl -	1
	90 sec à 72°C	1X	Nbre tot	6
10min à 72°C	Sécurité		10,00%	
<b>mix (25µl):</b>	<b>réactifs</b>	<b>quantité</b>	<b>cc finale</b>	<b>Mélanger</b>
	Master mix Qiagen 2x	12,50 µl	1x	82,5
	Solution Q (5x)	2,50 µl	0,5x	16,5
	eau	7,00 µl	-	46,2
	Primer mix (*)	1,00 µl	200nM	6,6
Répartir 23µl du mix/tubes de PCR Ajouter 2µl de DNA				

Tableau 05 : PCR multiplexe des gènes (CTX-M groupes 1, 2, 9).

	<b>Amplicon</b>	<b>pb</b>	<b>Souches contôles</b>	
	CTX-M-9 groupe	205	E.coli 526	
	CTX-M-1 groupe	415	E. cloacae 939	
	CTX-M-2 groupe	552	Salmo Typhimurium 105374	
	ADC (CI)	1059	ATCC 19606 ( <i>A. baumannii</i> )	
<b>Conditions amplification:</b>	<b>programme QIAGEN 57 ISO</b>		<b>Préparation du mix PCR</b>	
	15min à 95°C	1X	Nbre éch	44
	30 sec à 94°C	30X	Nbre de ctrl +	2
	90 sec à 57°C		Nbre de ctrl -	1
	90 sec à 72°C	1X	Nbre tot	47
10min à 72°C	Sécurité		10,00%	
<b>mix (25µl):</b>	<b>réactifs</b>	<b>quantité</b>	<b>cc finale</b>	<b>Mélanger</b>
	Master mix Qiagen 2x	12,50 µl	1x	646,25
	Solution Q (5x)	2,50 µl	0,5x	129,25
	eau	7,00 µl	-	361,9
	Primer mix (*)	1,00 µl	200nM (α)	51,7
(α) excepté CTXMG1woodFW (300 nM)				
Répartir 23µl du mix/tubes de PCR				
Ajouter 2µl de DNA				

Tableau 06 : PCR multiplexe des gènes (AmpC).

	<b>Amplicon</b>	<b>pb</b>	<b>Souches contôles</b>	
	FOX	190	EC Bicêtre FOX-3	
	ACT / MIR	302	KLPN GC2349 Bicêt. ACT-1	
	ACC	346	EC Bicêtre ACC-1	
	DHA	405	KLPN Bicêtre DHA-2	
	CMY-2	462	EC Bicêtre CMY-2	
	MOX / CMY-1	520	KLPN ou EC CMY-10	
	ADC (CI)	1059	ATCC 19606 ( <i>A. baumannii</i> )	
<b>Conditions amplification:</b>	<b>programme QIAGEN 57 ISO</b>		<b>Préparation du mix PCR</b>	
	15min à 95°C	1X	Nbre éch	14
	30 sec à 94°C	30X	Nbre de ctrl +	3
	90 sec à 57°C		Nbre de ctrl -	1
	90 sec à 72°C	1X	Nbre tot	18
10min à 72°C	Sécurité		10,00%	
<b>mix (25µl):</b>	<b>réactifs</b>	<b>quantité</b>	<b>cc finale</b>	<b>Mélanger</b>
	Master mix Qiagen 2x	12,50 µl	1x	700
	Solution Q (5x)	2,50 µl	0,5x	140
	eau	7,00 µl	-	392
	Primer mix (*)	1,00 µl	200nM	56
Répartir 23µl du mix/tubes de PCR			Ajouter 2µl de DNA	



Tableau 07 : PCR multiplexe des gènes (ArmA, RmtA, RmtC).

	<b>Amplicon</b>	<b>pb</b>	<b>Souches contôles</b>	
	rmtC	371	2012522	
	rmtA	635	pas de contrôle	
	armA	256	EC4470	
	ADC (CI)	1059	ATCC 19606 ( <i>A. baumannii</i> )	
<b>Conditions amplification:</b>	<b>programme QIAGEN 57 ISO</b>		<b>Préparation du mix PCR</b>	
	15min à 95°C	1X	Nbre éch	2
	30 sec à 94°C	30X	Nbre de ctrl +	2
	90 sec à 57°C		Nbre de ctrl -	1
	90 sec à 72°C	1X	Nbre tot	5
10min à 72°C	Sécurité		10,00%	
<b>mix (25µl):</b>	<b>réactifs</b>	<b>quantité</b>	<b>cc finale</b>	<b>Mélanger</b>
	Master mix Qiagen 2x	12,50 µl	1x	68,75
	eau	9,50 µl	-	52,25
	Primer mix (*)	1,00 µl	200nM	5,5
			Répartir 23µl du mix/tubes de PCR	
			Ajouter 2µl de DNA	

Tableau 08 : PCR multiplexe des gènes (RmtB, RmtD, npmA)

	<b>Amplicon</b>	<b>pb</b>	<b>Souches contôles</b>	
	npmA	371	pas de contrôle	
	rmtD	503	PYO SPM Bicêtre	
	rmtB	215	EC 4101540	
	ADC (CI)	1059	ATCC 19606 ( <i>A. baumannii</i> )	
<b>Conditions amplification:</b>	<b>programme QIAGEN 57 ISO</b>		<b>Préparation du mix PCR</b>	
	15min à 95°C	1X	Nbre éch	2
	30 sec à 94°C	30X	Nbre de ctrl +	2
	90 sec à 57°C		Nbre de ctrl -	1
	90 sec à 72°C	1X	Nbre tot	5
10min à 72°C	Sécurité		10,00%	
<b>mix (25µl):</b>	<b>réactifs</b>	<b>quantité</b>	<b>cc finale</b>	<b>Mélanger</b>
	Master mix Qiagen 2x	12,50 µl	1x	68,75
	eau	9,50 µl	-	52,25
	Primer mix (*)	1,00 µl	200nM	5,5
			Répartir 23µl du mix/tubes de PCR	
			Ajouter 2µl de DNA	

### 7.3. Electrophorèse et révélation

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR (amplicons) ont été visualisés par électrophorèse capillaire sur un instrument QIAXCEL (Qiagen Benelux) en utilisant le kit de haute résolution QIAXcel (QX DNA size marker 100–2500 bp and QX alignment markers 15/5000 bp) selon les recommandations du fabricant [124].

#### **7.4. Séquençage des produits d'amplification**

Les produits de PCR positifs (amplicons) ont été purifiés et séquencés au centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique, afin d'identifier précisément les gènes recherchés en comparant les produits du séquençage aux séquences rapportées dans Gen-Bank.

#### **8. Identification du clone ST131 chez les souches d'*E. coli***

L'identification du clone ST131 a été réalisée en utilisant la PCR spécifique de l'allèle du gène *papB* pour le clone O25b-ST131 (O25b-ST131 clone allele-specific PCR for the *papB* gene) selon la méthode décrite par Clermont *et al.*, 2009 [125].

#### **9. Détermination des groupes phylogénétiques des souches d'*E. coli***

La détermination des groupes phylogénétiques des souches d'*Escherichia coli* a été réalisée par la méthode de PCR du phylogroupe selon la méthode révisée de Clermont *et al.*, 2013 dont chaque souche a été attribuée à l'un des huit principaux groupes phylogénétiques qui sont les suivants : (A, B1, B2, C, D, E, F, et clade I) [126].

**Troisième partie**

**Résultats**

**Et**

**Discussion**



## 1. Souches étudiées et prélèvements

### 1.1. Souches bactériennes isolées

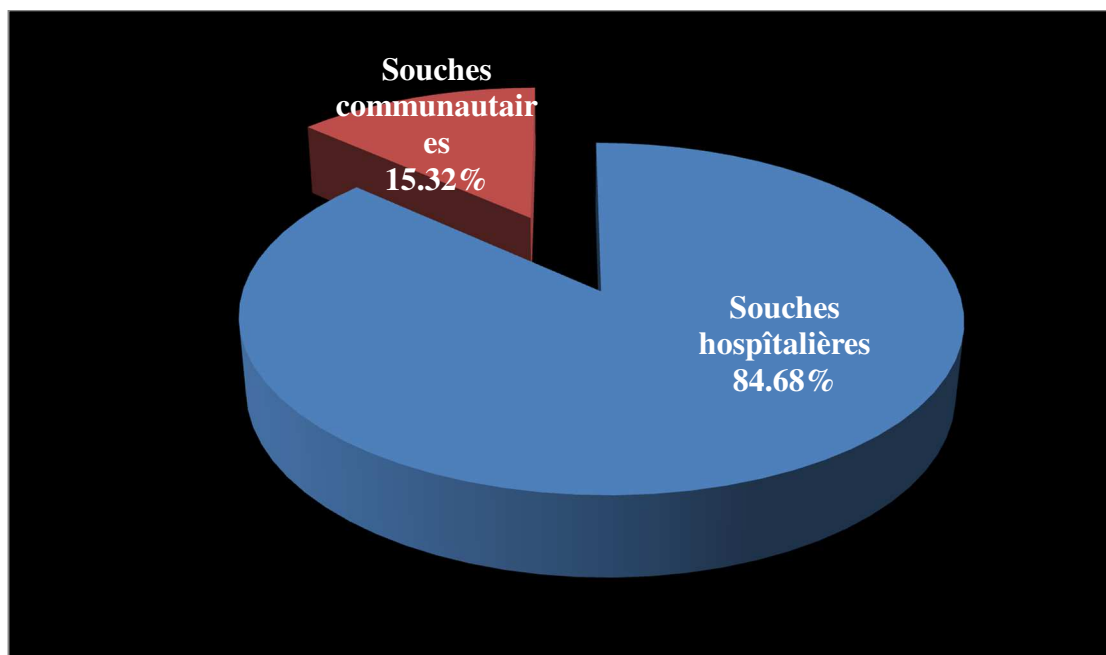
Durant la période d'étude, de Septembre 2013 à Juin 2015, 235 souches d'*Escherichia coli* ont été recueillies de différents services au CHU de Constantine. Parmi ces souches nous avons eu : 199 hospitalières et 36 externes.

### 1.2. Répartition des souches selon l'origine du prélèvement

La répartition des souches selon leur provenance et les résultats illustrés ci-dessous (Tableau 09, Figure 16) montrent une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires.

**Tableau 09** : Répartition des souches d'*E. coli* selon l'origine du prélèvement

Origine	Effectif	Pourcentage %
Souches hospitalières	199	84.68
Souches communautaires	36	15.32
Total	235	100



**Figure 16** : Répartition des souches d'*E. coli* selon l'origine du prélèvement

Un total de 199 souches d'*E. coli* (84.68 %) ont été isolées à partir de patients hospitalisés alors que 36 souches (15.32 %) ont été isolées des patients externes. Conformément aux données de la littérature [127, 128], l'espèce *E. coli* est plus fréquemment isolée à l'hôpital. Les hôpitaux sont des milieux qui représentent le réservoir de différentes maladies. Ils constituent un milieu propice pour la propagation des infections nosocomiales, lorsque les conditions d'hygiène et environnementales ne sont pas favorables. Les patients hospitalisés sont exposés à un risque des infections nosocomiales dont *E. coli* est l'agent causal le plus isolé [128, 129].

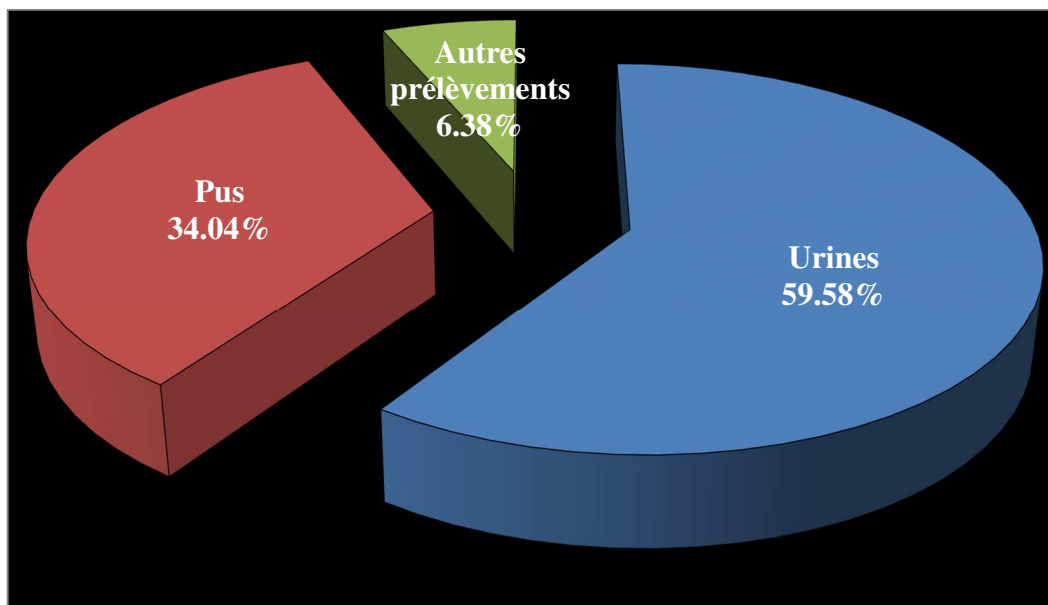
*Escherichia coli* est la bactérie la plus fréquemment incriminée dans les pathologies infectieuses aussi bien en milieu hospitalier qu'en communauté. Elle est caractérisée par son pouvoir particulier à acquérir de différents mécanismes de résistance vis-à-vis des antibiotiques ayant un pouvoir thérapeutique [130]. De ce fait, cette étude a été réalisée afin d'étudier la résistance aux antibiotiques, ainsi que les mécanismes responsables, chez des souches d'*E. coli* isolées au niveau de l'hôpital universitaire de Constantine à l'est algérien (CHU de Constantine).

Les entérobactéries sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires [131]. *E. coli* est également une cause fréquente d'infections urinaires acquises en milieu communautaire [132], ce qui affirme et concorde avec nos résultats qui d'après les fréquences d'isolement par rapport à la nature des prélèvements (Tableau 10, Figure 17) montrent que sur les 235 souches d'*E. coli* isolées, le taux d'isolement des souches d'*E. coli* le plus élevé a été obtenu avec les souches provenant des urines.

**Tableau 10 :** Répartition des souches d'*Escherichia coli* parmi les prélèvements cliniques

n= 235

<b>Prélèvements</b>	<b>N. d'<i>E. coli</i> isolée</b>	<b>Pourcentage %</b>
<b>Urines</b>	140	59.58
<b>Pus</b>	80	34.04
<b>Autres prélèvements</b>	15	6.38
<b>Total</b>	235	100



**Figure 17 :** Répartition des souches d'*Escherichia coli* parmi les prélèvements cliniques

*Escherichia coli* représente souvent la bactérie la plus identifiée parmi les bacilles à Gram négatif (BGN) isolés de prélèvements cliniques y compris les examens cyto bactériologiques des urines [133]. Dans notre étude, La fréquence des souches d'*E. coli* isolées lors des examens cyto bactériologiques des urines émanant des patients hospitalisés et externes est supérieure à celle retrouvée avec les autres types de prélèvement. Ceci se justifie par le fait que ce germe est majoritairement lié aux infections urinaires.

Cette fréquence d'isolement (59.58%) obtenue dans notre étude au CHU de Constantine (CHUc) (l'est algérien) entre 2013 et 2015 est supérieure à celle retrouvée à l'hôpital militaire de Constantine en 2012 dont (40.4%) des souches d'*E. coli* ont été isolées des prélèvements urinaires [134]. Par contre cette fréquence est inférieure à celle retrouvée à l'hôpital de Meknès au Maroc (73%) en 2015 [135]. Il est également à noter que nos résultats sont en parfait accord avec les résultats de plusieurs études européennes notamment celle de Grude *et al.* qui ont également retrouvé une prédominance d'*Escherichia coli* avec un taux de 56.7% [136].

En comparant nos résultats avec les données de littérature, on constate que Le profil des bactéries d'origine urinaire est dominé par les entérobactéries principalement l'*Escherichia coli* qui reste de loin l'agent pathogène responsable des infections urinaires, il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *Escherichia coli*. La fréquence d'isolement de cette bactérie parmi les différents prélèvements cliniques diffère selon les hôpitaux, et à l'écologie bactérienne de ces établissements [137].

## 2. Identification des souches d'*Escherichia coli*

### 2.1. Caractérisation par tests biochimiques

L'identification des 235 souches cliniques d'*E. coli* par galerie classique a été réalisée au laboratoire de bactériologie au CHU de Constantine. Les souches ont été isolées sur un milieu spécifique d'isolement des entérobactéries ; la gélose Hektoen.

#### ▪ Gélose Hektoen

Le milieu contient dans sa composition trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition du sulfure de fer au centre des colonies. Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

Les colonies d'*Escherichia coli* sur milieu Hektoen apparaissent sous forme de petites colonies jaunes saumon, lisses, et rondes (Figure 18).

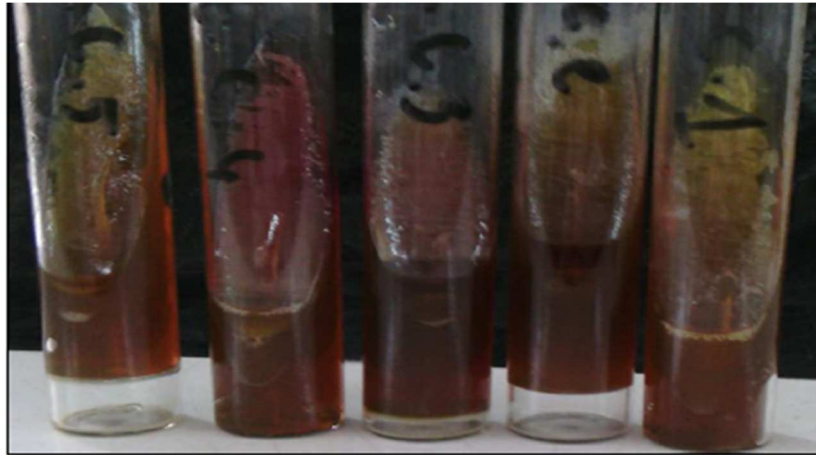


**Figure 18 :** Culture d'*Escherichia coli* sur gélose Hektoen

Après isolement, nous sommes passés à l'identification des souches d'*E. coli* en utilisant une série de tests biochimiques, dont les résultats obtenus représentaient les caractéristiques de l'espèce *E. coli* conformément à la littérature [138].

- **Milieu TSI**

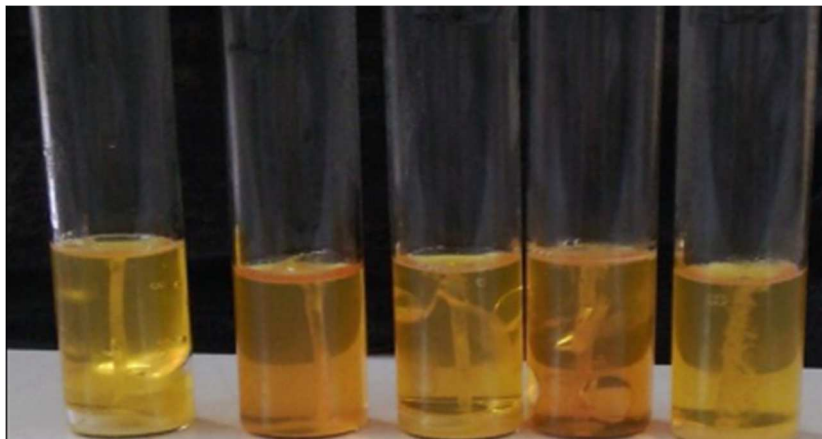
Après l'incubation, une acidification du milieu (la pente et le culot), a été observée d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec présence des bulles d'air, parfois décollement de la gélose et absence du noircissement du milieu. Toutes les souches d'*Escherichia coli* isolées ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose, en produisant du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S (Figure 19).



**Figure 19** : Aspect du milieu TSI avec *E. coli* (test positif)

- **Utilisation du mannitol et test de mobilité**

Une acidification du milieu d'où le virage du rouge de phénol au jaune a été observée avec les souches d'*Escherichia coli*, donc les souches sont mannitol(+). Ainsi que pour la mobilité ; les bactéries ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui signifie qu'elles sont mobiles (Figure 20).



**Figure 20** : Aspect du milieu mannitol-mobilité avec *E. coli* (test positif)

- **Utilisation du Citrate**

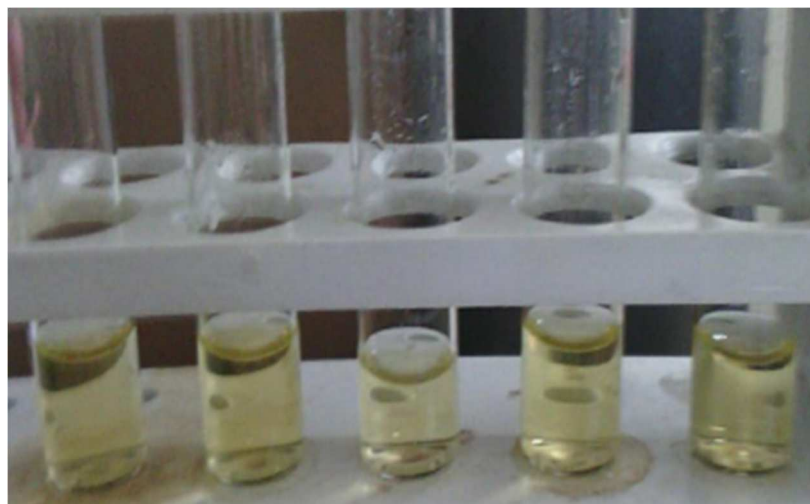
Après 24h d'incubation, l'absence du virage de couleur du vert au bleu signifie que les souches d'*E. coli* ne possèdent pas l'enzyme Citrate perméase et donc elles n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone (Figure 21).



**Figure 21 :** Aspect du milieu citrate de Simmons avec *E. coli* (test négatif)

- **Recherche de l'uréase et d'indole**

La production d'uréase se matérialise par un changement de la coloration du milieu au rouge, du fait de son l'alcalinisation. Les souches d'*Escherichia coli*, étaient uréase négatif (Figure 22).



**Figure 22 :** Aspect du milieu urée-indole avec *E. coli* (uréase négative)



La présence d'indole se matérialise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs. Les souches d'*Escherichia coli* ont dégradé le tryptophane en indole, donc elles étaient indole positif (Figure 23).



**Figure 23** : Aspect du test indole positif avec *E. coli*

## 2.2. Caractérisation par MALDI-TOF

Une seconde technique d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-Microflex a été utilisée pour l'identification des souches d'*E. coli* déjà identifiées par galerie classique. Cette technique a été réalisée dans le centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique. Cette technique a confirmé l'identification par galerie classique des souches d'*E. coli* isolées.

MALDI TOF identifie les microorganismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. Cette technique permet de mesurer les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en comparant le modèle respectif à une base de donnée étendue ouverte, pour déterminer l'identité du microorganisme jusqu'au niveau d'espèce (Tableau 11). L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI-TOF est  $\geq 1.9$  [116].

**Tableau 11** : Interprétation des scores d'identification bactérienne par MALDI-TOF

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	Green
1.900 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	Green
1.700 ... 1.899	probable genus identification	(+)	Yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	Red

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS (Microflex), des 235 souches d'*E. coli*, a donné de très bons scores et a confirmé nos résultats d'identification par tests biochimiques. Cependant Les méthodes d'identification par galeries classiques en se basant sur les tests biochimiques utilisées dans les laboratoires de routine ne garantissent une identification fiable que pour les espèces les plus fréquemment rencontrées en clinique. Dans la plupart des cas, l'identification bactérienne a lieu 48 heures après la réception du prélèvement; ce délai peut encore s'allonger dans le cas de bactéries à croissance lente et/ou difficile. Ce qui fait de cette technique un outil indispensable et intéressant permettant à un laboratoire de routine, non seulement d'identifier un grand nombre de bactéries mais aussi de réaliser cette identification de manière rapide, fiable et peu coûteuse. Plusieurs rapports ont montré la faisabilité de l'utilisation de cette technique afin d'identifier rapidement les microorganismes [140, 141, 142].

### 3. Résistance aux antibiotiques

#### 3.1. Analyse des souches au CHU de Constantine

La résistance aux antibiotiques pour la totalité des souches 235 souches d'*E. coli* a été déterminée dans un premier temps au laboratoire de bactériologie au CHU de Constantine en Algérie en utilisant la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller-Hinton MH selon les recommandations du CASFM. Seize antibiotiques ont été testés dont : l'amoxicilline, l'amoxicilline + clavulanate, la ticarcilline, la pipéracilline, la céfazoline, la céfoxitine, le céfotaxime, l'aztréonam, l'ertapénème, l'imipinème, la gentamicine,



l'amikacine, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, Sulfaméthoxazole + triméthoprime, et la colistine.

Les résultats de résistance des 235 souches d'*E. coli* étudiées vis-à-vis des antibiotiques testés sont présentés dans le tableau 12. Les résultats ont révélé que les isolats présentaient une résistance à plusieurs antibiotiques. Le taux de résistance des souches est plus élevé avec les antibiotiques suivants : amoxicilline, ticarcilline, amoxicilline + clavulanate, céfazoline, sulfaméthoxazole + triméthoprime, pipéracilline, et l'acide nalidixique. En revanche, toutes les souches étudiées (n= 235) ont été sensibles (100%) à deux antibiotiques : la colistine et l'imipénème. Cependant, deux souches d'*E. coli* (0.85%) des 235 souches étudiées étaient résistantes à l'ertapénème et elles se sont révélées résistantes à presque tous les antibiotiques testés, des différentes familles d'antibiotiques dont les bêta-lactamines, les aminosides, et les fluoroquinolones (Tableau 13).

En comparant nos résultats concernant le taux de résistance aux antibiotiques des 235 souches d'*E. coli* isolées au CHU de Constantine (l'est algérien) avec ceux issus d'une étude réalisée sur 240 souches d'*E. coli* isolées aux différents hôpitaux de l'ouest algérien [143], nous trouvons qu'ils sont en parfait accord et que les carbapénèmes (ertapénème, imipénème), la colistine, l'amikacine, et la céfoxitine restent les molécules les plus actives sur ces bactéries (Tableau 14). Et pour les autres antibiotiques, les différents taux de résistances qui ont été observés dans notre étude varient de 11.48% à 64.68%. En comparant nos résultats avec ceux qui ont été rapportés par l'étude réalisée sur des souches d'*E. coli* isolées aux différents hôpitaux de l'ouest algérien dont les taux de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés varient de 17.3% à 83.9%, nous constatons que la résistance d'*E. coli* aux antibiotiques varie en fonction des hôpitaux. En effet, les taux de résistance les plus élevés ont été notés aux hôpitaux de l'ouest pour la majorité des antibiotiques testés suivi du CHU de Constantine de l'est algérien.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a montré des résistances importantes des souches d'*E. coli* à l'ensemble des antibiotiques testés. Ces résistances seraient la conséquence de la consommation abusive de ces antibiotiques due à la prescription le plus souvent empirique de ces molécules particulièrement en médecine [144].

**Tableau 12 : Taux de résistance aux antibiotiques des 235 souches d'*E. coli* au CHU de Constantine**

Antibiotiques	Taux de résistance des 235 souches d' <i>E. coli</i>	
	Nombre (n)	Pourcentage %
<b>Amoxicilline</b>	152	64.68
<b>Amoxicilline + acide clavulanique</b>	140	59.57
<b>Ticarcilline</b>	149	63.40
<b>Pipéracilline</b>	91	38.72
<b>Céfazoline</b>	117	49.78
<b>Céfoxitine</b>	12	5.10
<b>Céfotaxime</b>	61	25.95
<b>Aztréonam</b>	50	21.27
<b>Ertapénème</b>	2	0.85
<b>Imipénème</b>	0	0
<b>Amikacine</b>	2	0.85
<b>Gentamicine</b>	27	11.48
<b>Acide nalidixique</b>	80	34.04
<b>Ciprofloxacine</b>	48	20.42
<b>Sulfaméthoxazole + Triméthoprime</b>	111	47.23
<b>Colistine</b>	0	0

**Tableau 13** : Profil de résistance des deux souches d'*E. coli* résistantes à l'Ertapénème

(N = 2 souches)

Antibiotiques	<i>E. coli</i> (EC1)	<i>E. coli</i> (EC2)
	Phénotypes : Résistante (R) Sensible (S)	Phénotypes : Résistante (R) Sensible (S)
Amoxicilline	R	R
Amoxicilline + acide clavulanique	R	R
Ticarcilline	R	R
Pipéracilline	R	R
Céfazoline	R	R
Céfoxitine	R	R
Céfotaxine	R	R
Aztréonam	R	R
Ertapénème	R	R
Imipénème	S	S
Amikacine	R	R
Gentamicine	R	R
Acide nalidixique	R	R
Ciprofloxacine	R	R
Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	R	R
Colistine	S	S

**Tableau 14 :** Taux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées dans différents hôpitaux (l'ouest et l'est algérien)

Antibiotiques	Taux de résistance (%)			
	Hôpital Constantine N= 235	Hôpital Telemcen N= 87	Hôpital Sidi bel Abbes N= 75	Hôpital Oran N= 78
<b>Amoxicilline</b>	64.68	83.9	60	66.7
<b>Amoxicilline + acide clavulanique</b>	59.57	69	46.7	24.4
<b>Ticarcilline</b>	63.40	83.9	60	66.7
<b>Pipéracilline</b>	38.72	80.5	56	66.7
<b>Céfoxitine</b>	5.10	20.7	8	9
<b>Céfotaxine</b>	25.95	69	21.3	28.2
<b>Aztréonam</b>	21.27	65.5	20	29.5
<b>Ertapénème</b>	0.85	0	0	0
<b>Imipénème</b>	0	0	0	0
<b>Amikacine</b>	0.85	13.8	1.3	5.1
<b>Gentamicine</b>	11.48	58.6	17.3	21.8
<b>Acide nalidixique</b>	34.04	58.6	33.3	32
<b>Ciprofloxacine</b>	20.42	56.3	25.3	30.8
<b>Sulfaméthoxazole + Triméthoprime</b>	47.23	63.2	48	23.1
<b>Colistine</b>	0	0	8	0

### 3.1.1. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des 235 souches étudiées a montré une dominance du phénotype de production de pénicillinase (PASE) induisant une résistance aux pénicillines testées avec 150 souches (63.82%). Le phénotype de production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) vient en seconde position avec 42 souches, soit (17.87%). suivi du phénotype sauvage, regroupant les souches n'ayant acquies aucune résistance aux antibiotiques testés, avec 40 souches, soit 17.02 %, ensuite le phénotype de production de Céphalosporinases (CASE) avec 6 souches (2.55%), et en dernière position le phénotype de Carbapénémase avec 2 souches (0.85%).

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par une étude réalisée au niveau des hôpitaux de l'ouest algérien, nous constatons que la répartition des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines diffère selon les hôpitaux. En effet, le taux des souches productrices de BLSE est très apparent aux CHUs de l'ouest par contre le phénotype PASE est le plus majoritaire au niveau du CHU de Constantine (l'est algérien) (Tableau 15) [143].

**Tableau 15 :** Répartition des phénotypes de résistance aux Béta-lactamines selon les hôpitaux

Hôpitaux	Phénotypes %			
	PASE	BLSE	Sauvage	CASE
<b>CHU de Constantine</b> <b>Année (2013- 2014)</b>	63.82	17.87	17.02	2.55
<b>CHUs de l'ouest</b> <b>Année (2008 – 2012)</b>	30.4	27.9	29.1	1.3

**BLSE :**  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ; **CASE :** céphalosporinase hyperproduite ou plasmidique ; **PASE :** pénicillinase.

### 3.2. Analyse des souches au CHU de Namur, Belgique

Sur l'ensemble des 235 souches recueillies au CHU de Constantine, 60 souches ont fait l'objet d'une étude approfondie dans le laboratoire du centre national belge de référence de la résistance aux antibiotiques, Namur, Belgique.

L'antibiogramme des 60 souches a été refait et réalisé par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Mueller-Hinton et a été interprété selon les recommandations du CLSI 2012, en testant les antibiotiques suivants : famille des bêta-lactamines (Aztréonam, Amoxicilline/Clavulanate, Ampicilline, Cefotaxime, Cefuroxime, Ceftazidime, Cefepime, Pipéra-cilline/Tazobactam, Témocilline, Cefoxitine, Ertapénem, Meropénem), famille des sulfamides (Cotrimoxazole), famille des quinolones (Ciprofloxacine), famille des aminosides (amikacine, et gentamicine).

#### 3.2.1. Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Les résultats de l'antibiogramme des 60 souches ont révélé la présence des phénotypes de résistance aux bêta-lactamines dont : 42 souches d'*E. coli* avec phénotype BLSE, 13 souches avec phénotype PASE, 6 souches avec phénotype CASE, 2 souches avec phénotype carbapénémase, et 2 souches sauvages.

Le profil de résistance aux antibiotiques des souches analysées a montré que toutes les souches du phénotype BLSE exprimaient une multirésistance vis-à-vis des antibiotiques testés. Ces souches de phénotype BLSE sont très résistantes à l'ampicilline, au céfuroxime, au céfotaxime, au céfépime, et à l'aztréonam. Le taux de résistance des souches à d'autres antibiotiques testés était élevé pour la gentamicine avec (63%), ciprofloxacine avec (61%), et cotrimoxazole avec (60%), mais faible pour l'amikacine avec (5%). Par contre les souches ont montré un taux de sensibilité élevé au pipéracilline-tazobactam avec (95%), à l'ertapénème et l'imipénème avec une fréquence de (95%), témocilline (92%), céfoxitine (85%), amoxicilline-clavulanate (83%) et ceftazidime (66%) (Tableau 16).

**Tableau 16 :** Le profil de résistance des souches d'*E. coli* BLSE (n = 42 souches)

Antibiotiques	Souches d' <i>E. coli</i> BLSE	
	Phénotype	Pourcentage %
<b>Ampicilline (AM)</b>	Résistante (R)	100
<b>Céfuroxime (CXM)</b>		99
<b>Céfotaxime (CTX)</b>		99
<b>Céfépime (FEP)</b>		70
<b>Aztréonam (ATM)</b>		65
<b>Gentamicine (GM)</b>		63
<b>Ciprofloxacine (CIP)</b>		61
<b>Cotrimoxazole (SXT)</b>		60
<b>Amikacine (AN)</b>		5
<b>Pipéracilline-tazobactam (TZP)</b>		Sensible (S)
<b>Ertapénème (ERT)</b>	95	
<b>Méropénème (MEM)</b>	95	
<b>Témocilline (TEM)</b>	92	
<b>Céfoxitine (FOX)</b>	85	
<b>Amoxicilline-clavulanate (AMC)</b>	83	
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	66	

Dans notre étude, les résultats de l'antibiogramme concernant les souches BLSE d'*E. coli* ont montré des résistances importantes à l'ensemble des antibiotiques testés. Les souches BLSE hydrolysent la majorité des bêta-lactamines en n'épargnant que les céphamycines (comme la céfoxitine) et les carbapénèmes (Figure 24). La résistance aux aminopénicillines est la plus fréquente (Tableau 16). Ces résultats sont similaires à d'autres études [145, 146, 147, 65]. Cette résistance est acquise et serait la conséquence de la consommation abusive de ces antibiotiques dans les pays en développement [148].

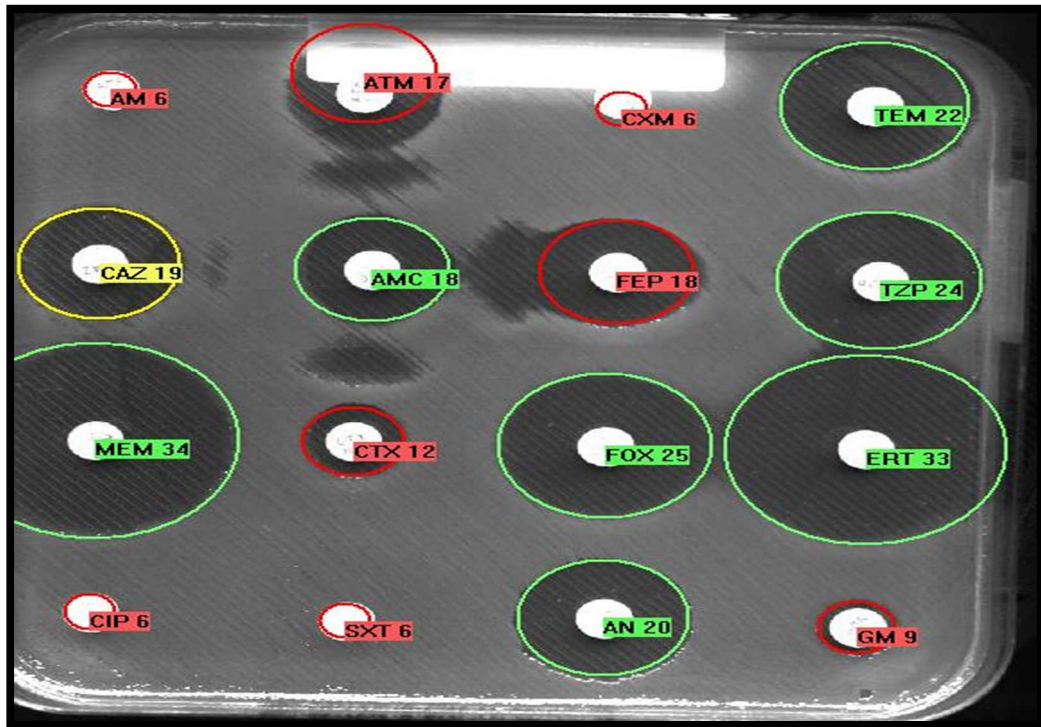


Figure 24 : Souche d'*E. coli* avec phénotype BLSE

### 3.2.2. Résistances associées (Résistance aux aminosides)

Les résistances aux aminosides utilisés dans notre étude (gentamicine, et amikacine) étaient plus fréquentes chez les souches produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu BLSE, seules ou en association avec des céphalosporinases. L'analyse des résultats de l'antibiogramme a montré une résistance considérable à la gentamicine chez les E-BLSE qui a atteint (63%). Par contre, ces souches BLSE gardaient une bonne sensibilité à l'amikacine (5% de résistance) (Tableau 16), ce qui en fait l'aminoside de choix en cas de nécessité d'association d'antibiotiques pour le traitement. Nos résultats concordent parfaitement avec ceux rapportés par une étude réalisée sur des souches d'*E. coli* isolées dans quelques hôpitaux de l'ouest algérien dont le taux de résistance à la gentamicine était (73.1%) et à l'amikacine

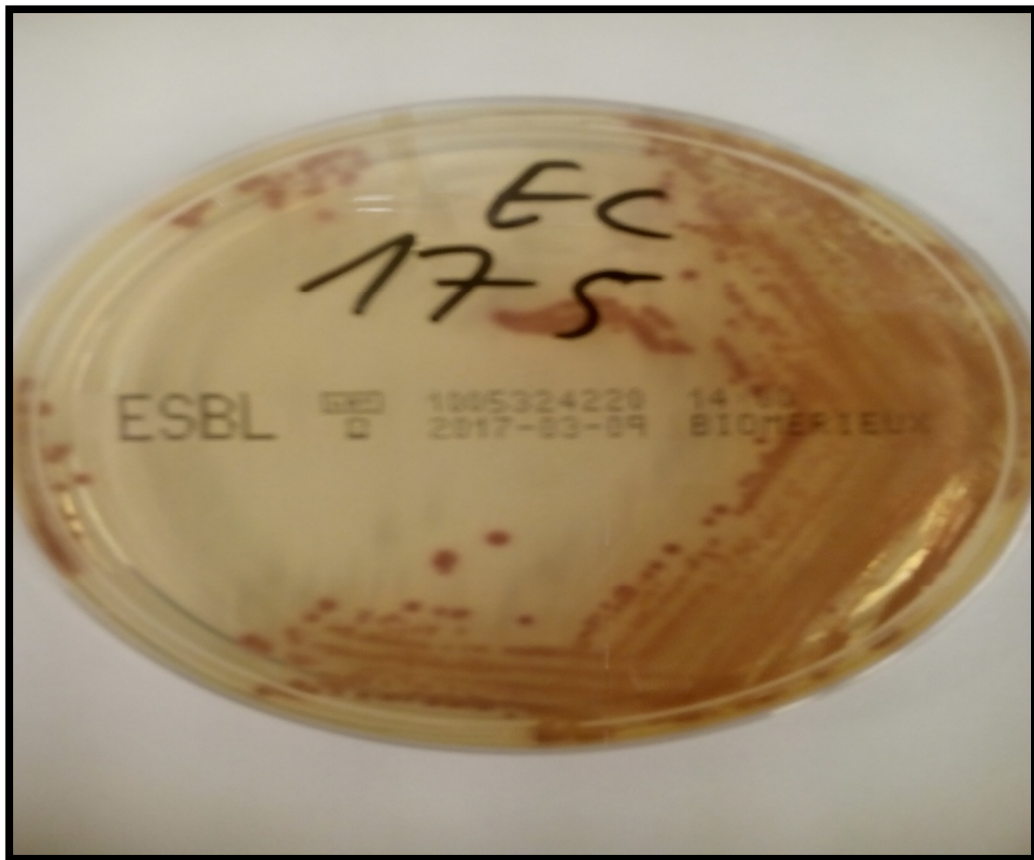


(6%) ; résultats rapportés également par une autre étude réalisée sur des souches d'*E. coli* isolées à l'hôpital de Meknès au Maroc dont les taux de résistance de ces souches vis-à-vis de la gentamicine et l'amikacine étaient respectivement de 67.2%, et 6.1% [143, 135].

#### 4. Détection phénotypique des BLSE

##### 4.1. Gélose ESBL (biomérieux)

La recherche des bêta-lactamases à spectre étendu sur gélose ESBL a montré que sur l'ensemble des souches analysées, 42 souches d'*E. coli* ont présenté des colonies de couleur rose à bordeaux, ce qui indique qu'elles sont productrices d'enzyme bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE+). En revanche, aucune culture n'a été observée sur le milieu ESBL pour les souches restantes (BLSE-) (Figure 25).

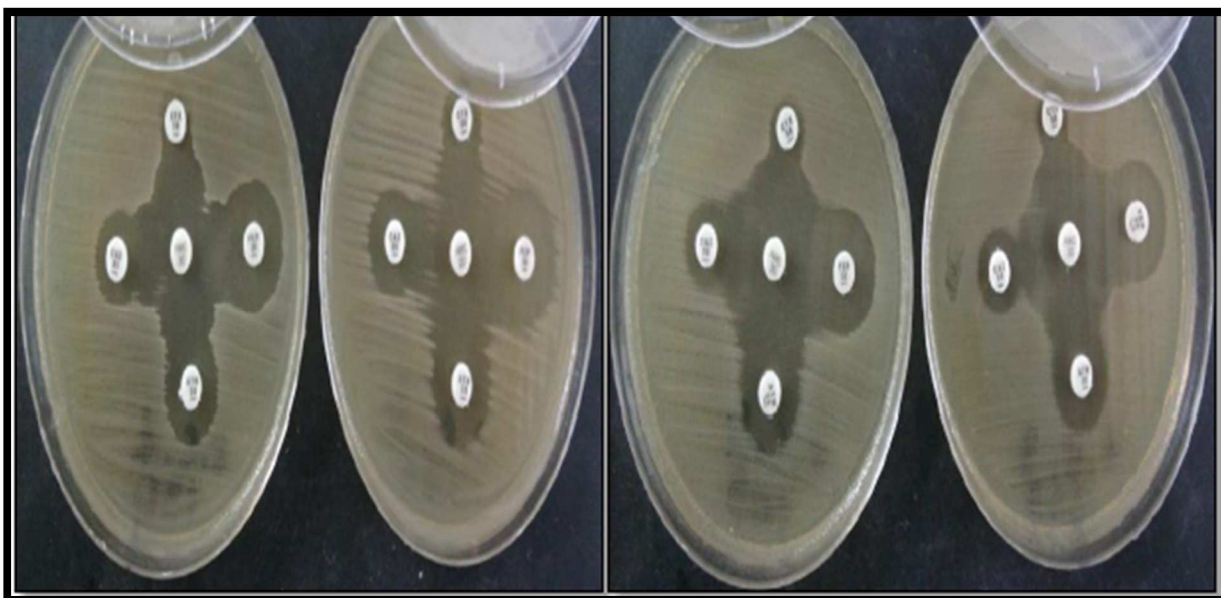


**Figure 25 :** Détection de la production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu sur milieux ESBL Biomérieux avec *E. coli*

#### 4.2. Test de synergie

Concernant le test de synergie, dans notre étude, nous avons remarqué une augmentation de la zone d'inhibition des disques contenant les céphalosporines (Céfotaxime, Céfotaxime, Céfèpime), en direction du disque porteur d'acide clavulanique. En d'autres termes, une augmentation de la zone d'inhibition obtenue pour les céphalosporines en présence d'acide clavulanique, par rapport à la zone d'inhibition d'une céphalosporine seule, ce qui indique la présence d'une BLSE.

La lecture des résultats a révélé la présence d'une image de synergie ou en « bouchon de champagne » entre les disques utilisés chez 39 souches d'*E. coli* indiquant clairement la production de BLSE par ces souches (figure 26) ; ce résultat est conforme avec celui de El Bouamri *et al*, 2014. Cependant, l'absence des images de synergie chez les souches restantes et qui ont donné un résultat positif sur le milieu chromogénique ESBL, peut être expliquée par l'hyperproduction des céphalosporinases chromosomiques ou plasmidiques par ces souches. Ce dernier type d'enzyme va masquer la synergie en raison de la résistance des Béta-lactamases de la classe C (Céphalosporinases CASE) vis-à-vis de certains C3G et aussi aux inhibiteurs des Béta-lactamases (acide clavulanique). La lecture du test de synergie s'avère souvent délicate pour cela des tests complémentaires doivent être pratiqués comme le cas des milieux chromogéniques ESBL [149, 150].



**Figure 26 :** Test de synergie positif de quelques souches d'*E. coli* BLSE+

## 5. Détection phénotypique des carbapénémases

La détection phénotypique des carbapénémases est réalisée pour les 2 souches résistantes à l'ertapénème en utilisant plusieurs tests.

### 5.1. Test Carba NP Modifié

Le test Carba NP détecte l'hydrolyse des carbapénèmes par les bactéries productrices de carbapénémases. L'hydrolyse du carbapénème acidifie le milieu ce qui provoque un changement de couleur de l'indicateur de pH, indiquant de manière précise la présence d'une résistance aux carbapénèmes de type enzymatique (Tableau 17) [119, 151].

**Tableau 17 :** Interprétation des résultats du Carba NP test modifié

Interprétation	Tube A	Tube B
<b>Pas de carbapénémase</b>	Rouge	Rouge
<b>Carbapénémase</b>	Rouge	Orange/Jaune
<b>Non interprétable</b>	Jaune	Jaune

Le test Carba NP est un test rapide pour le dépistage des bactéries productrices de carbapénémases. Dans notre étude ce dosage est basé sur l'hydrolyse de l'ertapénème avec un changement de couleur d'un indicateur phénolique du rouge à l'orange ou jaune (résultat positif).

Le Test Carba NP présente de très bonnes sensibilité et spécificité (100%). cette méthode s'inscrit dans une démarche de criblage simple, rapide et efficace des souches suspectes. Ce test différencie parfaitement les bactéries productrices de carbapénémase des bactéries résistantes aux carbapénèmes sans production de carbapénémases (par exemple : défaut de perméabilité de la membrane externe associé à une hyperproduction de céphalosporinases et/ou à des BLSE). Ce test permet d'obtenir des résultats interprétables en moins de 2 heures, en mettant en place des mesures de confinement rapide pour limiter la propagation des bactéries productrices de carbapénémases [151].

Dans notre étude, seules deux souches d'*E. Coli* (*E. coli* 175, *E. coli* 178) se sont révélées productrices des carbapénémases (Figure 27). Nos résultats concordent avec ceux retrouvés par certains auteurs [119, 151].



**Figure 27** : Test Carba NP positif avec deux souches d'*E. coli* (EC 175, EC 178)

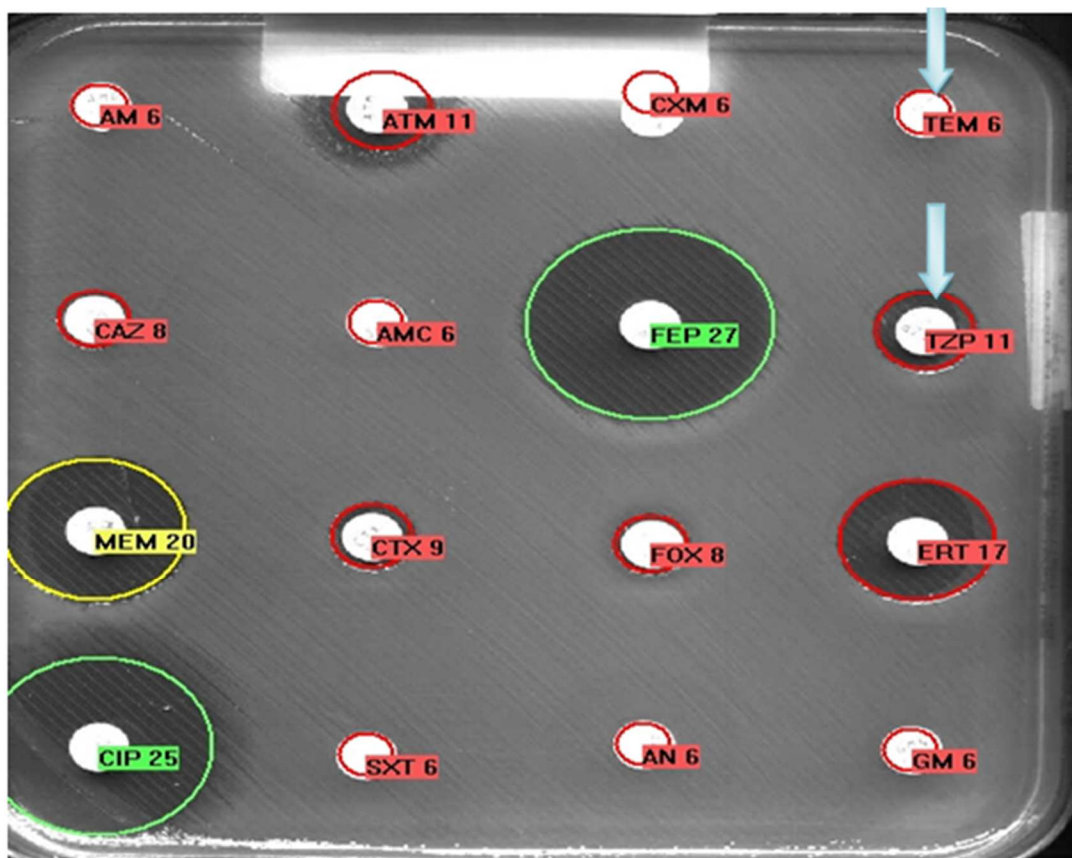
T+ : Témoin positif carbapénémase +

T- : Témoin négatif carbapénémase –

Le test Carba NP modifié permet la détection rapide de différentes carbapénémases (types : KPC, MBL, et OXA) des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, et *Acinetobacter* en utilisant un protocole unique. Ce test présente de multiples avantages. Il est peu coûteux, et rapide. Il permet d'éviter l'utilisation d'autres techniques pour identifier les producteurs de carbapénémases qui prennent du temps et qui sont moins sensibles et spécifiques [119].

## 5.2. Test Phénotypique à la témocilline

Selon Te-Din Huang *et al.* 2013, la résistance à la témocilline avec une zone d'inhibition dont le diamètre est  $< 12$  et la résistance à la pipéracilline-tazobactam avec une zone d'inhibition dont le diamètre est  $< 16$  peuvent servir comme marqueurs pour la détection des carbapénémases de type OXA-48 [120]. Dans notre étude, deux souches ont été résistantes à la témocilline et à la pipéracilline-tazobactam (Figure 28). Ces mêmes souches ont été également révélées productrices de carbapénémases selon le test Carba NP.



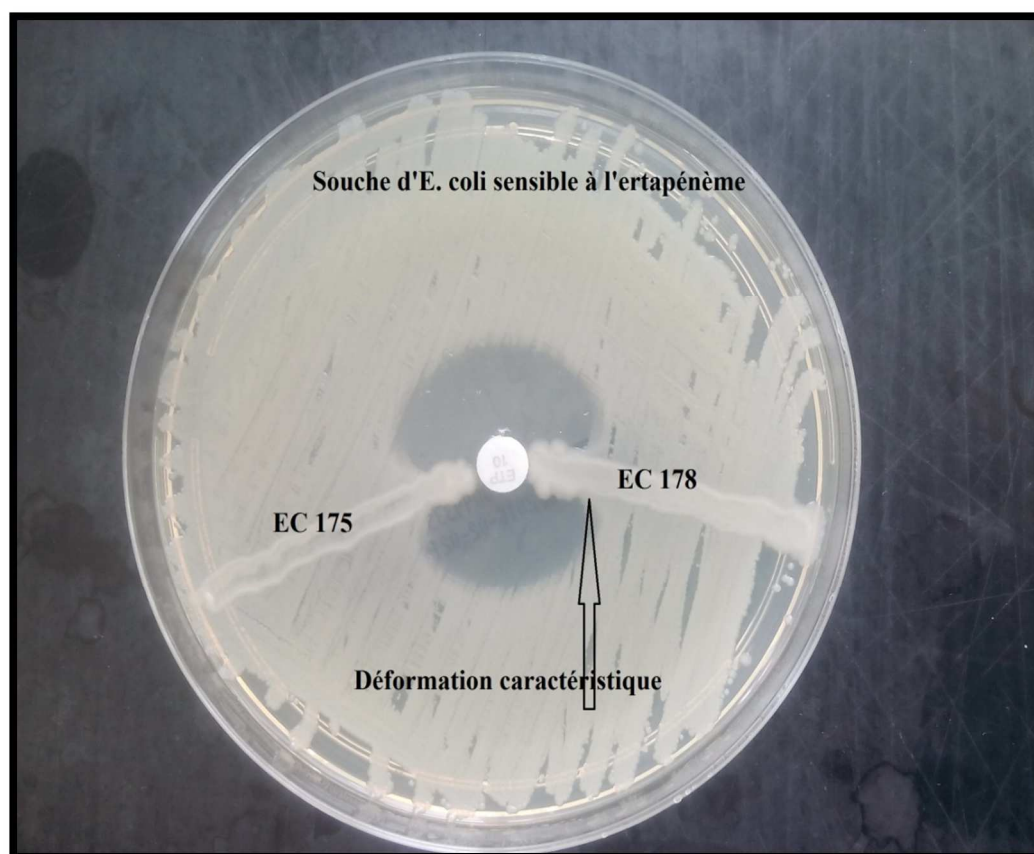
**Figure 28 :** Test phénotypique positif (à la témocilline et à la pipéracilline-tazobactam)

D'après, les résultats de l'antibiogramme, nous remarquons que les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec la témocilline ( $D= 6\text{mm}$ ) et la pipéracilline-tazobactam ( $D= 11\text{mm}$ ) sont respectivement  $< 12\text{ mm}$  et  $< 16\text{mm}$  conformément à la littérature [120], ce qui laisse prédire la présence d'une carbapénémase de type OXA-48 chez ces deux souches d'*E. coli*. Cependant certaines espèces sont naturellement résistantes à cet antibiotique (ex. *Hafnia alvei*) et d'autres mécanismes assez rares peuvent induire une résistance à la témocilline []. Ce qui fait de ce test réalisé seul, un outil insuffisant pour la détection des carbapénémases et qui nécessite la réalisation d'autres tests complémentaires confirmatifs de la présence des carbapénémases chez une bactérie donnée [152].



### 5.3. Test de Hodge modifié

Ce test est réalisé afin de chercher phénotypiquement la production des carbapénémases. Sa réalisation est relativement simple : une souche d'*E.coli* est ensemencée sur une gélose Mueller-Hinton et un disque de carbapénème est déposé au centre de la boîte; la souche à tester est ensemencée par une strie partant du disque d'antibiotique jusqu'au bord de la boîte. Après incubation pendant 18h à 37°C, la présence d'une carbapénémase est révélée par une déformation de la zone d'inhibition due à l'activité enzymatique autour du disque d'antibiotique proche de la souche suspecte, sans pouvoir identifier la carbapénémase en cause. Dans notre étude ce test est positif pour les 2 souches testées (Figure 29). Il s'agit de l'inactivation du carbapénème par des souches productrices de carbapénémases qui permettent à une souche indicatrice sensible aux carbapénèmes de prolonger sa croissance le long de la bande d'inoculum de la souche testée productrice de carbapénémase..

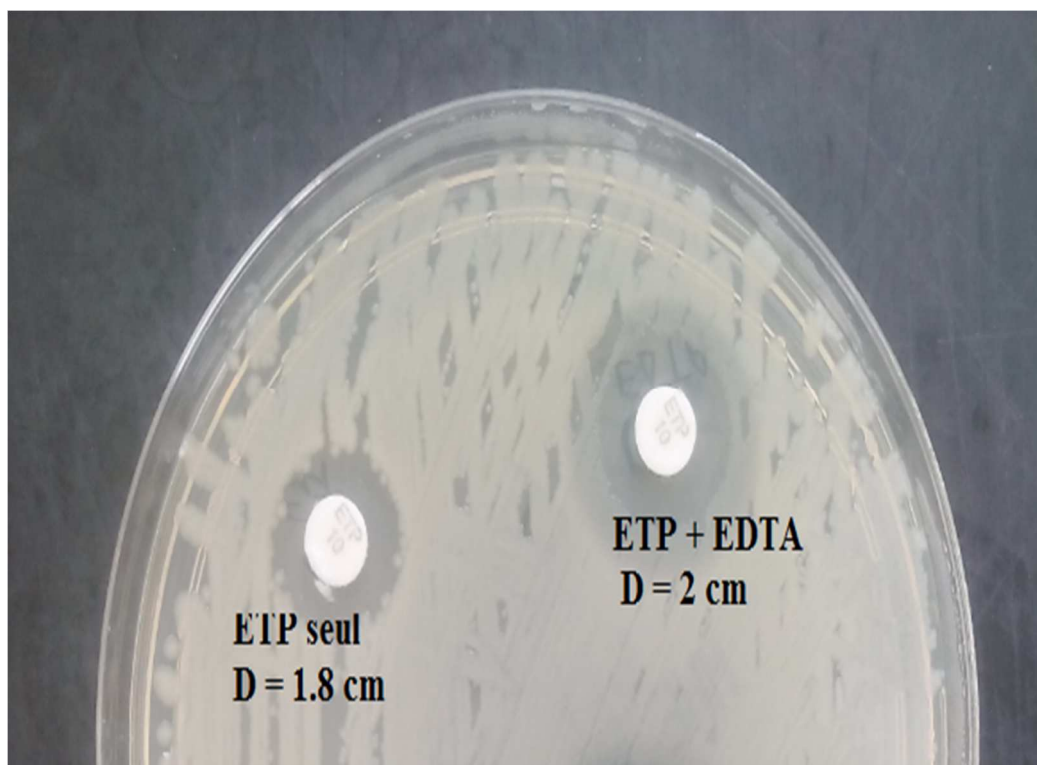


**Figure 29** : Test de Hodge modifié positif avec deux souches d'*E. coli*

(EC175, EC178)

#### 5.4. Test à EDTA-ETP

Ce test permet de différencier entre les métallo- $\beta$ -lactamases et les autres carbapénèmases de classe A ou D. Le résultat du test de EDTA-ETP des 2 souches résistantes à l'ertapénème nous montre, après une incubation de 24 heures à 37°C, que les souches ne sont pas productrices d'une Métallo-Bêta-Lactamase (M $\beta$ L) (figure30), les diamètres des zones d'inhibition autour de ces disques sont mesurés et comparés. Les souches dont le diamètre d'inhibition, autour du disque ETP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque de l'ETP seul d'au moins 7mm, sont considérées comme productrices de métallo- $\beta$ -lactamases. Dans notre étude, la différence entre les diamètres mesurés est de l'ordre de 2mm cette valeur est < 7mm, ce qui prouve que ces bactéries ne sont pas productrices de métallo- $\beta$ -lactamases conformément à la littérature [122].

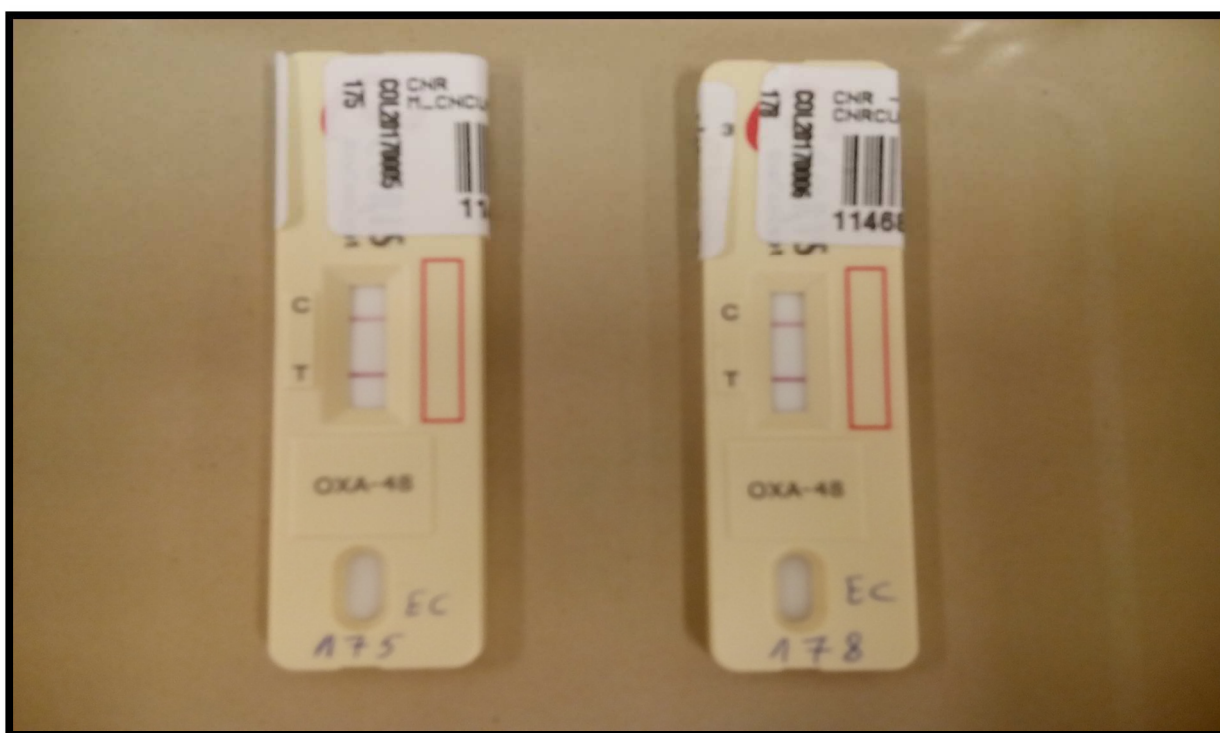


**Figure 30** : Test à EDTA négatif chez une souche d'*E. coli* résistante à l'ertapénème

### 5.5. Test immunochromatographique (K-Set-OXA-48)

Ce test permet la mise en évidence rapide d'une carbapénémase de type OXA-48. Il permet une détection facile et rapide (15 minutes) des carbapénémases à partir d'une culture. Ces tests sont actuellement disponibles pour la recherche d'OXA-48, KPC, NDM et VIM. Le test immunochromatographique OXA-48 K-Set (CORIS BioConcept) est un test de pratique et d'interprétation très simples, il se présente sous forme de kits prêts à l'emploi, qui ne nécessitent aucun matériel ou réactifs additifs. Dans notre étude ce test a présenté une excellente sensibilité de détection. Les résultats positifs ont été lus très rapidement. Ce test pourrait de ce fait être très utile pour les laboratoires de microbiologie, ainsi que les unités d'hygiène hospitalière pour la détection rapide de la production de carbapénémases de type OXA-48 parmi les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes [153].

Dans notre travail, les deux souches résistantes à l'ertapénème testées ont donné un résultat positif avec ce test qui se manifestait par l'apparition de la bande contrôle (C) + la bande test (T) (Figure 31).



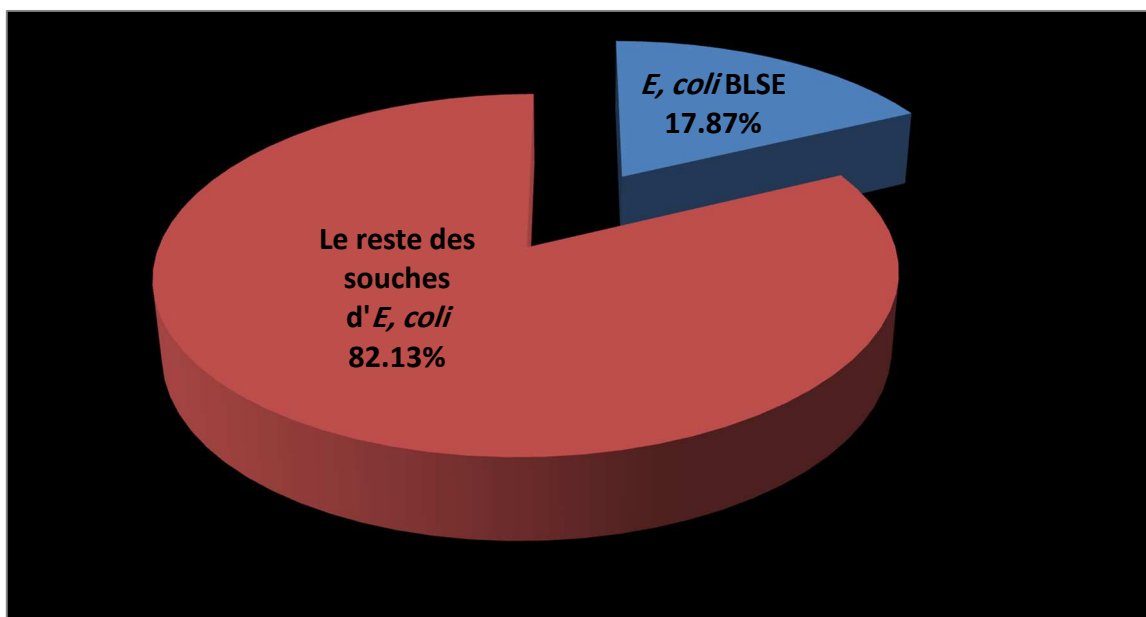
**Figure 31 :** Test immunochromatographique (K-Set-OXA-48) positif à carbapénémases  
OXA-48



## 6. Profil phénotypique des souches d'*E. coli* productrices des BLSE

### 6.1. Fréquence des souches d'*E. coli* BLSE

Au total de 235 souches, nous avons relevé la présence de 42 souches d'*E. coli* (17.87%) productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, provenant de différents patients, soit une souche par malade (Figure 32).



**Figure 32 :** Fréquence des souches d'*E. coli* BLSE

La prévalence de production de BLSE chez *E. coli* que nous avons observé dans notre étude a été de (17.87%). Cette prévalence est relativement élevée en comparaison avec celles rapportées par Touati *et al.*, 2006 (2.4%) en Algérie, en Europe (7.4%), en Afrique (5.1%) et en USA (2.8%) [154]. Par contre, cette prévalence trouvée dans notre étude est inférieure à celles rapportées par des études dans d'autres pays avec des taux élevés de BLSE, comme Indonésie 18 % et 24% respectivement rapportées par Severin *et al.* [155], au Mali où 21% et 37.8% respectivement trouvées par Duval *et al.* [156], en Asie (36.1%), et en Amérique du sud (26.8%) [154]. Généralement, la prévalence de la production de BLSE varie d'une région à une autre, d'un pays à un autre, d'une ville à une autre, et même d'un hôpital à un autre. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels l'utilisation abusive des antibiotiques comme les C3G dans les hôpitaux. En effet, la prévalence des phénotypes de résistance constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription des antibiotiques [157].

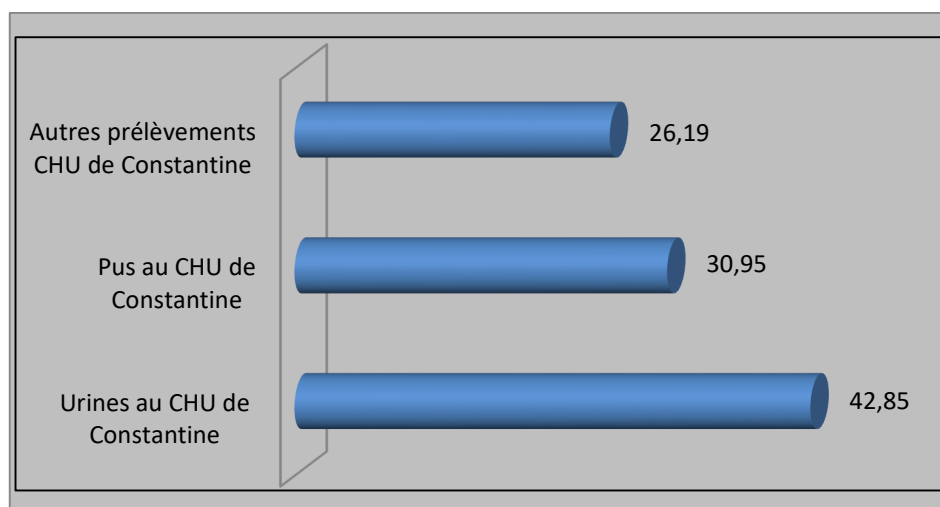
## 6.2. Répartition des souches d'*E. coli* BLSE selon la nature des prélèvements

La répartition des BLSE présentée dans le tableau 18, montre que le site le plus concerné par les BLSE était les urines (42.86%), suivis par le pus avec (30.95%), puis d'autres prélèvements avec (26.19%).

**Tableau 18 :** Répartition des souches d'*E. coli* BLSE selon la nature des prélèvements

Prélèvements	Nombre d' <i>E. coli</i> BLSE isolées	Pourcentage %
Urines	18	42.86
Pus	13	30.95
Autres prélèvements	11	26.19
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>100</b>

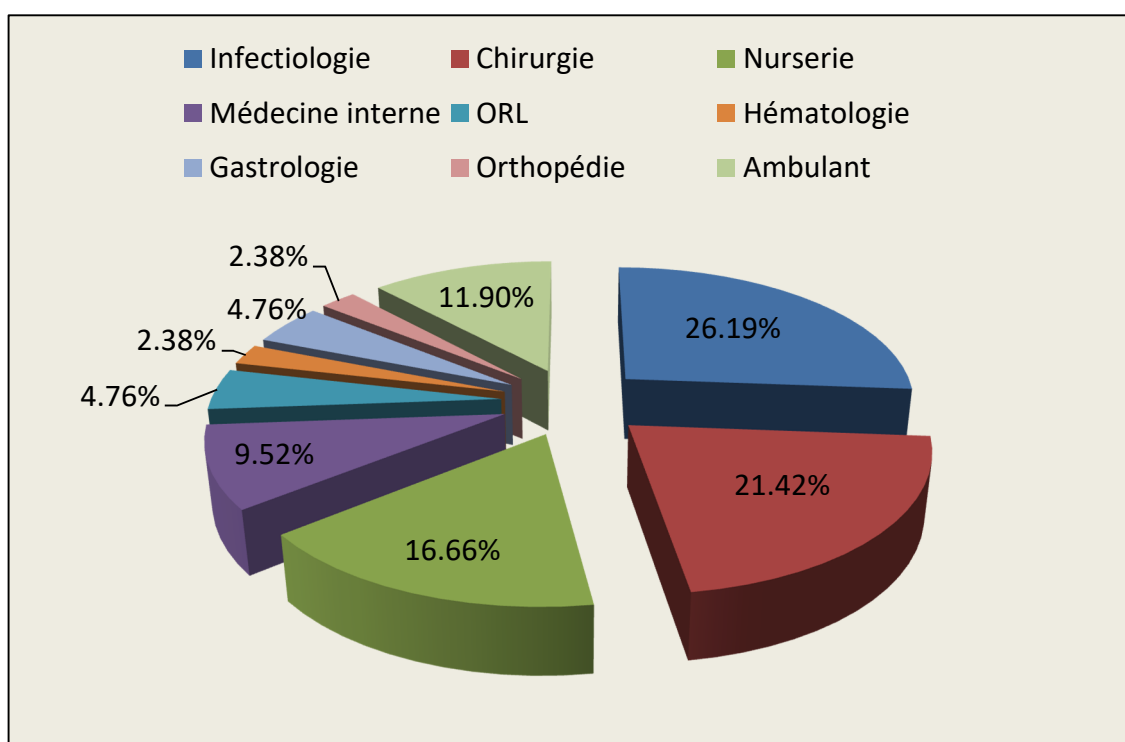
Selon nos résultats, durant la période de notre étude (deux ans) de 2013 à 2014 les BLSE étaient majoritairement isolées des urines (42.86%) (Figure 33), ce qui rejoint les données de la littérature issues d'une étude réalisée en Algérie (le centre) entre 2010 et 2012 [158] ; où le taux de BLSE isolées des urines était le plus élevé par rapport aux autres sites de prélèvement avec un taux de 40% conformément à d'autres études de Bermudes *et al.* et de Canton *et al.* qui rapportent que la majorité des souches BLSE proviennent des urines [159, 160].



**Figure 33 :** Répartition des souches d'*E. coli* BLSE selon les prélèvements

### 6.3. Répartition des souches d'*E. coli* BLSE en fonction des services

Notre étude a permis de noter une importante prévalence d'isolement des BLSE particulièrement chez les patients hospitalisés (88.09 %) dont la plus grande prévalence (26.19%) a été enregistrée dans le service de l'infectiologie suivi par les services de chirurgie et de nurserie avec respectivement des taux de 21.42% et 16.66% . Les autres services étaient répartis comme suivant : Médecine (9.52%), ORL (4.76%), Gastrologie (4.76%), Hématologie (2.38%), et orthopédie (2.38%) (Figure 34).



**Figure 34 :** Répartition des souches d'*E. coli* BLSE selon les services d'origine

Alors que les souches d'*E. coli* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) étaient observées essentiellement en milieu hospitalier avec (88.09%), la diffusion de ces germes multirésistants en milieu communautaire est de plus en plus inquiétante. La transmission, principalement plasmidique, des gènes codants pour les BLSE est responsable de leur dissémination rapide et ainsi de l'augmentation de la prévalence des bactéries productrices de BLSE partout dans le monde [161, 162].

Dans cette étude, les souches d'*E. coli* BLSE ont été essentiellement collectées au niveau des services de l'infectiologie (26.19%) dont les urines étaient les principaux sites d'isolement des souches étudiées. Ce résultat corrobore ceux de Mohammed Sbity *et al.* 2017

et Agabou *et al.*, 2014 qui ont rapporté l'isolement fréquent d'*E. coli* dans les urines. Elle représente l'agent principal des infections urinaires [134, 135].

Dans ces services de l'infectiologie, les bactéries sont soumises à une pression élevée des antibiotiques. Bien plus, plusieurs de ces patients sont particulièrement vulnérables aux infections suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des dispositifs invasifs. En effet, les patients hospitalisés au sein de ces services présentent plus de risques à contracter une BLSE. Selon une étude recherchant les facteurs de risque d'infection par *E. coli* BLSE, a montré que, une infection urinaire récente, le caractère nosocomial de l'infection et l'antibiothérapie par aminopénicillines, céphalosporines étaient parmi les facteurs de risque d'infection à *E. coli* BLSE [163].

## **7. Caractérisation moléculaire des BLSE**

Sur l'ensemble des isolats étudiés, 42 souches d'*E. coli* ont été détectées productrices de BLSE, et des PCR ont été réalisées pour la recherche des gènes codant les B-lactamases suivantes : CTX-M du groupe 1, CTX-M du groupe 2, CTX-M du groupe 9, TEM, SHV et OXA-1/-30. Les amorces utilisées pour la détection de l'ensemble de ces gènes sont listées dans le tableau 19. Pour toutes les réactions de PCR, des témoins positifs et négatifs ont été utilisés.

La PCR utilisée dans notre étude est de type multiplex dont plusieurs couples d'amorces sont ajoutés dans un même tube et la PCR s'effectue en même temps pour chaque couple d'amorces. La PCR multiplexe permet donc la mise en évidence de plusieurs cibles dans un seul tube.

**Tableau 19** : Amorces utilisées pour les réactions de PCR multiplexe des gènes codant des BLSE

Gènes Cibles	Amorces	Séquences
<b>CTX-M Groupe1</b>	<i>CTX-M-gr1-F</i>	AAA AAT CAC TGC GYC AGT TC
	<i>CTX-M-gr1-R</i>	AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT
<b>CTX-M Groupe2</b>	<i>CTX-M-gr2-F</i>	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T
	<i>CTX-M-gr2-R</i>	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG
<b>CTX-M Groupe9</b>	<i>CTX-M-gr9-F</i>	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG
	<i>CTX-M-gr9-R</i>	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC
<b>TEM</b>	<i>TEM- F</i>	CAA CTC GGT CGC CGC ATA CAC TA
	<i>TEM- R</i>	CGG GAG GGC TTA CCA TCT GGC
<b>SHV</b>	<i>SHV- F</i>	CGA AAG ATC CAC TAT CGC CAG CAG
	<i>SHV- R</i>	ATT CAG TTC CGT TTC CCA GCG G
<b>OXA30</b>	<i>OXA30- F</i>	TGG AAC AGC AAT CAT ACA CCA
	<i>OXA30- R</i>	TAA ACC CTT CAA ACC ATC CGT
<b>ADC (Contrôle interne)</b>	<i>ADC- F</i>	GTA CCT CAA TTT ATG CGG RCA ATA C
	<i>ADC- R</i>	TGC GYT CTT CAT TTG GAA TAC G

### 7.1. BLSE de type CTX-M

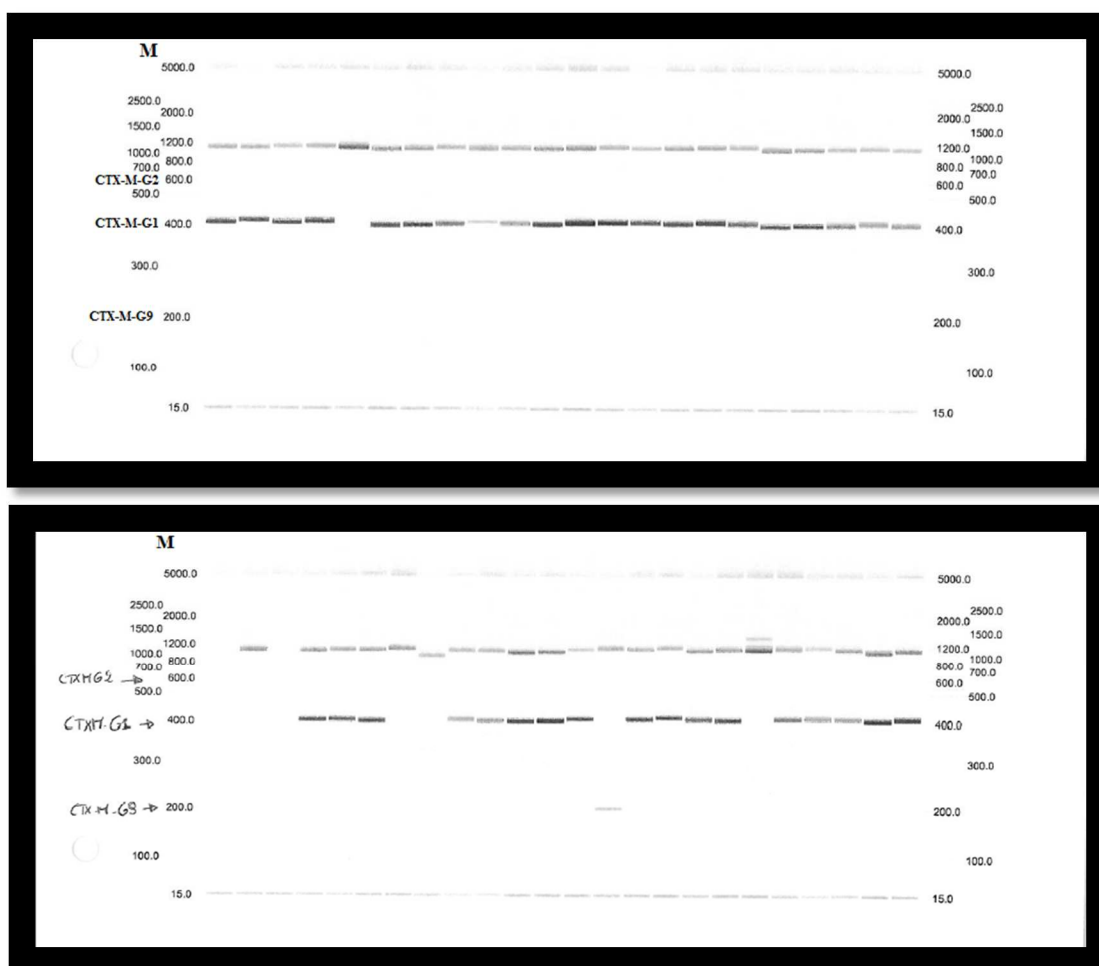
L'analyse des résultats d'amplification d'ADN bactérien par PCR multiplexe en utilisant les amorces spécifiques et l'observation des bandes correspondantes, nous ont permis de décrire la présence des gènes *CTX-M*-groupe 1 chez 38 souches, et des gènes *CTX-M*-groupe 9 chez une seule souche (Figure 35) selon la distribution suivante :

33 (78.57%) souches *d'E. coli* possédaient le gène *CTX-M-15* du groupe 1.

5 (11.90%) souches *d'E. coli* possédaient le gène *CTX-M-1* du groupe 1.

Une (2.38%) souche *d'E. coli* possédait le gène *CTX-M-14* du groupe 9.

Par contre Les résultats de PCR pour les gènes *CTX-M*-groupe 2 ont été négatifs pour toutes les souches analysées.



**Figure 35** : Profil électrophorétique des BLSE type CTX-M

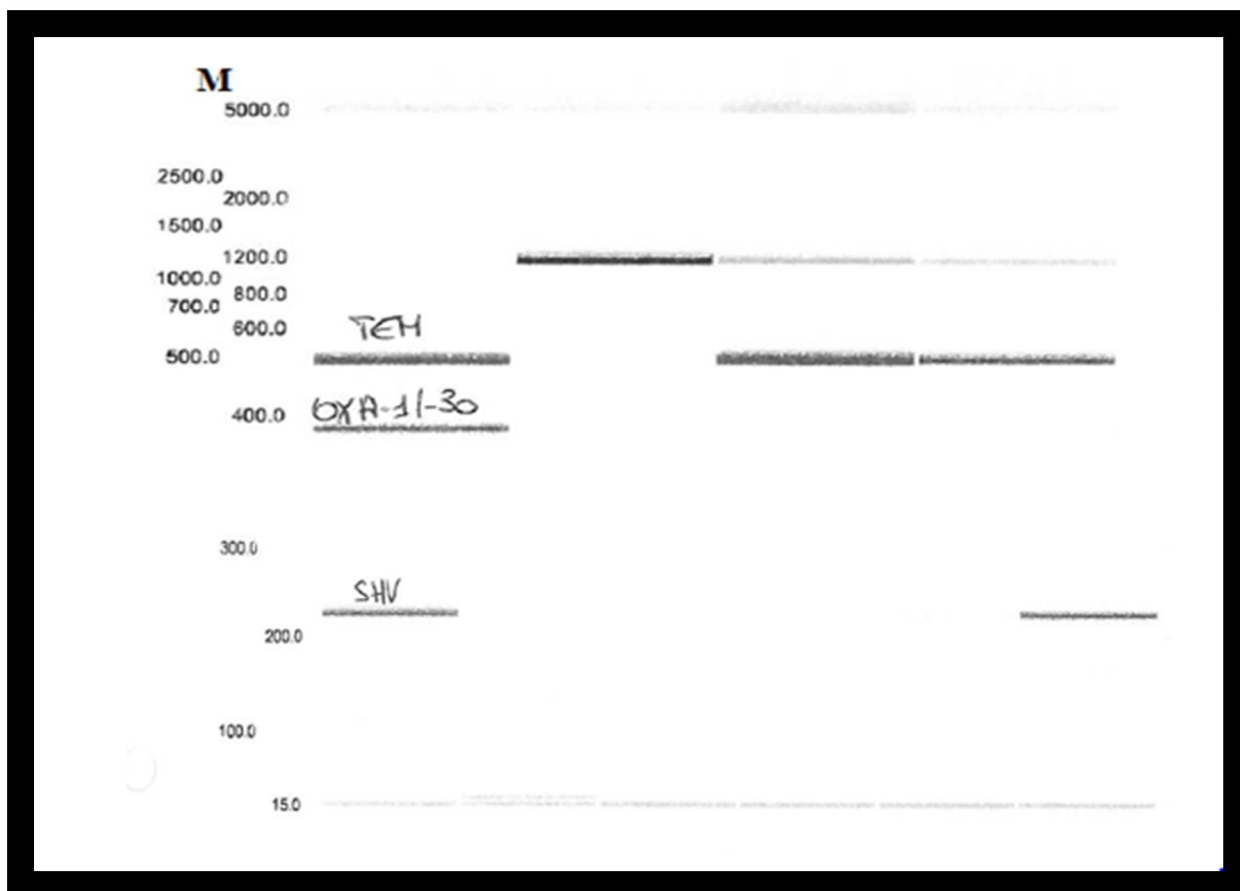
(M : Marqueur du poids moléculaire d'ADN)

## 7.2. BLSE de type SHV et TEM

Une BLSE de type SHV-2 a été observée seulement chez une seule souche d'*E. coli*, isolée en 2013 provenant d'un patient homme hospitalisé dans le service de médecine interne ; soit une prévalence de 2.38 % (Figure 36).

Des  $\beta$ -lactamases de type TEM-1 ont été peu fréquentes, elles ont été retrouvées chez deux souches d'*Escherichia coli* Ec175 et Ec178, soit une prévalence de 4.76 %. Les deux souches ont été isolées dans la même l'année 2014, dans le même service: infectiologie (Figure 36).

Les résultats de PCR pour les gènes codant une OXA-1/-30 ont été négatifs pour toutes les souches analysées (Figure 37).



**Figure 36** : Profil électrophorétique des BLSE de type SHV / TEM et B-lactamases OXA-1/30

(M : Marqueur du poids moléculaire d'ADN)

Des études épidémiologiques ont rapporté des situations endémiques des entérobactéries productrices de BLSE, dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud, avec des prévalences élevées des CTX-M: de 30 à 90% pour *E. coli* et de 10 à 60% pour *K. pneumoniae* [175, 176]. Cela a été également observé dans notre étude dont 39 des 42 souches d'*E. coli* BLSE étudiées soit (92.85%) produisaient des enzymes de type CTX-M.

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en (1986) au Japon, Allemagne et France en 1989 et ont depuis lors disséminé largement dans le monde. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Ces BLSE ont été retrouvées majoritairement chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence parmi d'autres espèces et genres d'entérobactéries est rapide. Les groupes 1, 9 et 2 sont actuellement prédominants. Dans la majorité des isolats cliniques, ces enzymes sont codées par des plasmides, au sein desquels coexistent fréquemment des gènes codant pour d'autres  $\beta$ -lactamases comme TEM-1, TEM-2 ou OXA-1. La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion [164].

Parmi les BLSE décrites dans cette étude, CTX-M-15 représente l'enzyme prédominante au niveau du CHU de Constantine avec (78.57%). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs études précédentes qui confirment la prédominance de CTX-M-15 parmi les BLSE détectées chez *E. coli* en Algérie [143, 165, 166, 167, 168, 169]. La même situation est observée en Tunisie [170] et au Maroc [171], illustrant la diffusion d'*E. coli* productrice du CTX-M-15 dans les pays d'Afrique du Nord.

D'autres types de CTX-M ont été également détectés dans notre étude, mais avec une faible fréquence. Il s'agit de CTX-M-1 (5 souches), CTX-M-14 (1 seule souche). L'enzyme CTX-M-14, a été déjà identifiée chez cinq souches cliniques à l'hôpital de Beni-Messous à Alger et chez deux souches isolées à l'hôpital de Telemcen (ouest algérien) [169, 143]. Tandis que CTX-M-1 détectée dans notre étude a été aussi identifiée dans d'autres études chez des souches d'origine animale [172, 173] et chez des souches cliniques provenant des hôpitaux situés à l'ouest algérien [143].

En ce qui concerne les BLSE de type TEM, la majorité de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de la B-lactamase originale (TEM-1 ou TEM-2). Dans notre étude la B-lactamase TEM-1 a été détectée chez deux souches d'*E. coli*, cette enzyme a été identifiée aussi dans plusieurs études précédentes où le TEM-1 a été retrouvé chez 95 souches



dans une étude menée par Yahiaoui *et al.* en 2015 et chez 46 souches d'*E. coli* dans une étude réalisée par Ayad *et al.* en 2016 [174, 143].

Les autres BLSE retrouvées dans la présente étude sont des SHV-2 (2.38%) chez une seule souche d'*E. coli*. Les enzymes de ce type SHV-2 dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. En Algérie, les BLSE de type SHV-2 sont très rarement trouvées ; en effet une étude réalisée par Yahiaoui *et al.* en 2015 a révélé la présence de l'enzyme BLSE de type SHV-2a dans des souches d'*E. coli*. Cette enzyme SHV-2a est un dérivé de mutation ponctuelle de SHV-2 [174, 177].

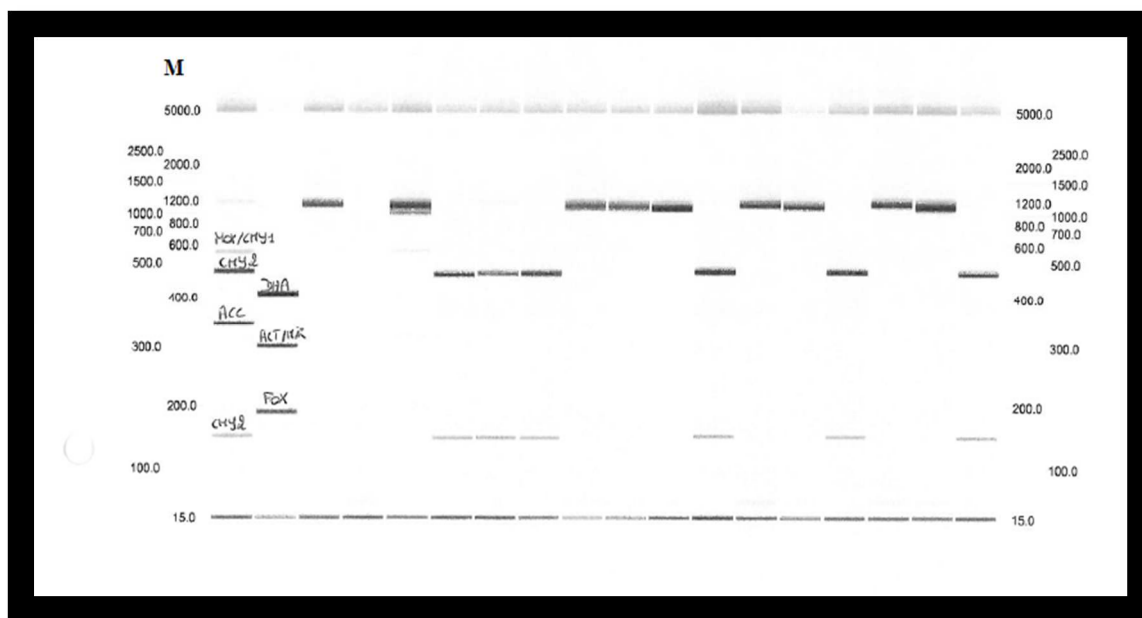
Notre étude révèle donc la présence de cette enzyme SHV-2 pour la première fois dans des souches d'*E. coli* isolées au CHU de Constantine (l'Est algérien). Par contre une autre étude a révélé la présence des BLSE de type SHV-12 dans des souches d'*E. coli* provenant de prélèvements cliniques dans des hôpitaux de l'ouest algérien [143].

## 8. Caractérisation moléculaire des Céphalosporinases

Les  $\beta$ -lactamases de la classe C (AmpC) sont codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Ces céphalosporinases sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces  $\beta$ -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Le gène AmpC constitutif est faiblement exprimé chez *E. coli* et est absent chez *Klebsiella et Salmonella spp.* Les souches d'*E. coli* expriment naturellement une céphalosporinase chromosomique AmpC à bas niveau qui induit une résistance à la première et à la plupart de la deuxième génération de céphalosporines. Un traitement par les céphalosporines de troisième génération, ou une mutation dans le gène represseur *AmpR* mènent à une production d'AmpC à des hauts niveaux, cette céphalosporinase déréprimée génère une résistance à presque tout les bêta-lactamines, seul le céfépime peut garder son activité [179].

L'analyse moléculaire des gènes codant pour des céphalosporinases a été réalisée en utilisant une PCR multiplexe. D'après nos résultats 10% (6 souches) des souches résistantes isolées au CHU de Constantine à l'Est Algérien ont été révélées productrices de céphalosporinases (Figure 37) dont :

- 3 souches étaient productrices des céphalosporinases seules de type : CMY-2, CMY-4, et CMY-42.
- 3 souches étaient productrices des céphalosporinases de type : CMY-2 et CMY-16 en association avec la production des BLSE.



**Figure 37** : Profil électrophorétique des B-lactamases de type AmpC

(M : Marqueur du poids moléculaire d'ADN)

CMY est le type d'AmpC le plus répandu présentant la plus large distribution géographique [180]. Les variants de CMY détectés dans notre étude de type : CMY-2, CMY-4 et CMY-42 ont été déjà rapportés en Algérie chez *E. coli* dans plusieurs études [180, 181]. Le type CMY-2 est le plus fréquent notamment en Europe (France, Espagne, Italie) et dans les pays africains comme la Tunisie et l'Algérie [182, 183, 184, 143]. Cependant l'enzyme CMY-16 identifiée dans notre étude, a été détectée pour la première fois en Algérie en 2016 par Ayad *et al.* chez une seule souche clinique d'*E. coli* isolée au CHU d'Oran (Ouest algérien) [143].

CMY-16 est un variant de CMY qui a été détecté pour la première fois chez *Proteus mirabilis* isolé en Italie [185] et depuis lors, il a été détecté dans le monde entier. La CMY-16 s'est avéré être le variant le plus répandu parmi les B-lactamases AmpC en Europe [186]. Dans notre étude cette B-lactamase AmpC de type CMY-16 a été détecté dans deux souches d'*E. coli* en association avec des B-lactamases de type TEM-1 conformément aux résultats d'une étude réalisée en Italie qui a démontré aussi la coexistence de CMY-16 en association

avec TEM-92 dans des isolats de *Proteus mirabilis* [187]. Le même résultat a été observé dans une autre étude en Croatie où la CMY-16 a été trouvée dans des souches de *Proteus mirabilis* en association avec la B-lactamase TEM-1 [188]. En outre cette enzyme CMY-16 a été aussi détectée dans des souches d'*E. coli* en Tunisie en association avec OXA-1[189].

## 9. Caractérisation moléculaire des Carbapénémases

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes pose un problème thérapeutique majeur dans les hôpitaux car les carbapénèmes sont souvent les antibiotiques utilisés pour le traitement des infections causées par des bactéries multirésistantes [190, 191]

Les carbapénémases sont des  $\beta$ -lactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ces enzymes appartiennent à trois classes selon la classification d'Ambler : la classe A (exp : KPC), la classe B correspond aux métallo- $\beta$ -lactamases (exp : VIM, IMP et NDM) et la classe D correspond essentiellement aux enzymes de type oxacillinase (exp : OXA-48) [109]. L'identification des carbapénémases a été réalisée en utilisant la PCR multiplexe en amplifiant les gènes *blaOXA-48*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaKPC* et *blaNDM* (Tableau 20).

**Tableau 20** : PCR multiplexe des carbapénémases.

<b>Amplicon</b>	<b>Taille (Pb paire de base)</b>
<b>NDM</b>	603
<b>VIM</b>	437
<b>IMP</b>	387
<b>KPC</b>	353
<b>OXA-48</b>	265

Les résultats de la PCR multiplexe des gènes codant pour des carbapénémases et le séquençage de l'ADN correspondant aux bandes positives chez les deux souches résistantes à l'ertapénème ont révélé la présence d'une carbapénémase de type OXA-48 chez les deux souches d'*E. coli* analysées.

La carbapénémase OXA-48 a été identifiée pour la première fois chez une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* en Turquie en 2006 [192], ensuite le gène codant pour cette enzyme a été détecté dans des souches d'*E. coli* et *Citrobacter freundii* dans le même pays Turquie [193]. Depuis 2008, ce gène a été décrit dans de nombreux autres pays, et le plus souvent dans des isolats de *Klebsiella pneumoniae* [194, 195, 196].

L'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes met en péril l'utilisation des carbapénème [197]. La prévalence de la production de carbapénémases chez les différentes espèces bactériennes varie d'un pays à l'autre. L'OXA-48 a été détectée dans les pays d'Afrique du Nord et ces pays ont été considérés comme des réservoirs des bactéries productrices de carbapénémases OXA-48 [194].

En Algérie, en 2013 un rapport de surveillance de la production des carbapénémases à l'ouest algérien à l'hôpital de Tlemcen a révélé qu'il n'y avait pas de production des enzymes OXA-48 [167]. Cependant d'autres types de carbapénémases de type OXA ont été rapportés en Algérie comme (OXA-23, OXA-24, et OXA-58) à Annaba et Tlemcen (Est et Ouest algériens) [199, 200, 201]. Poirel *et al.* a rapporté que l'enzyme OXA-48 peut être endémique en Algérie, car sa propagation a été observée dans différents pays voisins (Tunisie, Maroc, et Libye) [171, 198, 202] et dans les pays méditerranéens aussi (Espagne, France, Italie, Liban, et Turquie [192, 203, 194] mais sa détection a été chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* et non pas *E. coli*. En 2014, une étude réalisée par Agabou *et al.* a révélé pour la première fois, la production des carbapénémase de type OXA-48 en Algérie chez une souche d'*E. coli* isolée à l'hôpital militaire de Constantine (Est algérien) [134].

Dans notre étude, le principal support moléculaire de la résistance aux carbapénèmes est la présence du gène *blaOXA-48* codant pour une carbapénémase de classe D. Ce gène a été détecté chez deux souches d'*E. coli* isolées de deux différents patients hospitalisés au CHU de Constantine. L'existence des souches d'*E. coli* résistantes aux carbapénèmes grâce à une carbapénémase de classe D de type *blaOXA-48* n'a jamais été décrite auparavant au CHU de Constantine. Les échanges entre les bactéries sont nombreux et pas seulement au sein d'une même espèce. Ces échanges jouent un rôle important dans la dissémination des gènes codant pour une carbapénémase grâce au transfert horizontal de plasmides portant le gène *blaOXA-48* entre les différents groupes bactériens.

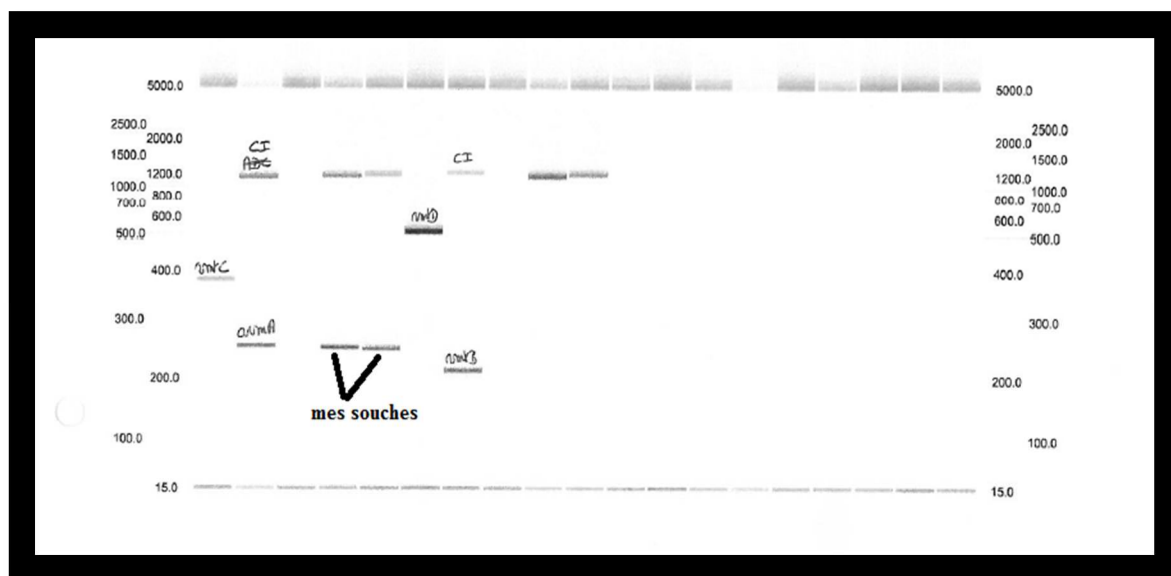
## 10. Caractérisation moléculaire des résistances aux aminosides

Les résultats d'amplification des gènes codant pour la résistance aux aminoglycosides par PCR multiplexe en utilisant les amorces spécifiques (Tableau 21) ont montré que parmi les 60 souches sélectionnées pour l'analyse moléculaire, 2 souches d'*E. coli* possèdent Le gène *armA* (Figure 38) codant des méthylases de l'ARNr 16S. Ces deux souches ont présenté des résistances à l'ensemble des aminosides testés (Gentamicine et Amikacine) et elles sont les mêmes souches révélées productrices de carbapénémases de type OXA-48, des céphalosporinases AmpC de type CMY-16 et aussi la B-lactamase TEM-1. Elles ont été isolées au CHU de Constantine dans le service de l'infectiologie provenant des prélèvements urinaires.

Les résultats de PCR pour les gènes *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* et *npmA* ont été négatifs pour toutes les souches d'*E. coli*.

**Tableau 21** : Amorces utilisées pour les réactions de PCR multiplexe des gènes codant des méthylases de l'ARNr 16S

Gènes Cibles	Amorces	Séquences
<i>armA</i>	<i>armA</i> -F	ACG ATA TTG ATA GAG CTG AGA TAG
	<i>armA</i> -R	TCC ATT CCC TTC TCC TTT CC
<i>rmtA</i>	<i>rmtA</i> -F	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC
	<i>rmtA</i> -R	TTT GCT TCC ATG CCC TTG CC
<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i> -F	AAC GAT GCC CTC ACC TCC AT
	<i>rmtB</i> -R	TTT ACA TCG CCC GCA RAA AG
<i>rmtC</i>	<i>rmtC</i> - F	CGT ACG GAG TGG GAA AAA GA
	<i>rmtC</i> - R	TCC TGC CGA TCG AGT AGA GT
<i>rmtD</i>	<i>rmtD</i> - F	AAA CTG CTC GCT TCG AAA AA
	<i>rmtD</i> - R	GGC AGC ACC TTA AAC AGC AG
<i>npmA</i>	<i>npmA</i> - F	GGA GGG CTA TCT AAT GTG GT
	<i>npmA</i> - R	GCC CAA AGA GAA TTA AAC TG



**Figure 38:** Profil électrophorétique des gènes codant des méthylases de l'ARNr 16S

(M : Marqueur du poids moléculaire d'ADN)

Les aminosides continuent à jouer un rôle important dans le traitement des infections sévères dues aux pathogènes à Gram négatif souvent en association avec les  $\beta$ -lactamines à large spectre [204]. Ces antibiotiques agissent en se liant au site aminoacyl (site A) de l'ARN16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines [204]. La liste des aminosides utilisés en thérapeutique humaine est restreinte puisque limitée à quelques antibiotiques y compris la gentamicine et l'amikacine. Leur utilisation massive a contribué à la dissémination, dans le monde entier, de souches résistantes par différents mécanismes incluant : la production des méthylases de l'ARNr 16S.

Dans notre étude c'est le gène *armA* qui a été identifié, ce gène responsable de la production de méthylases de l'ARNr 16S, conférant une résistance aux aminosides les plus utilisés en clinique [205]. En effet, 2 (4.76%) souches parmi les 42 souches EcBLSE étudiées produisaient des méthylases de l'ARNr 16S. Cette fréquence est supérieure à celles rapportées au Japon (0.03%) [209], en France (1.3%) [207], et en Turquie (0.7%) [208]. Mais elle reste inférieure à celles rapportées en Chine (10%) [209], et en Algérie (18%) [143].

En Algérie, le gène *armA* a été identifié pour la première fois chez des souches d'entérobactéries isolées chez un patient algérien transféré en Belgique [210]. Il a été par la suite identifié chez des souches cliniques de *Salmonella enterica* à Constantine sur des

plasmides conjugatifs portant aussi les gènes *blaTEM-1* et ceux codant pour les types CTX-M-3 ou CTX-M-15 [211, 212] de même que chez des souches cliniques de *Salmonella non-Typhi* à Annaba associé aux gènes codant pour les types CTX-M-15 et CMY-2 [213], ensuite il a été détecté chez différentes souches cliniques de bacilles à Gram négatif en association avec plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques [214, 215, 216, 217]. Par contre la détection du gène *armA* chez les souches d'*E. coli* a été rapportée pour la première fois en Algérie en 2016 d'après une étude réalisée par Ayad *et al.* sur des souches d'*E. coli* isolées au niveau de trois CHUs à l'ouest algérien où le gène *armA* a été isolé chez quatre souches productrices de différents types de BLSE (CTX-M-15, CTX-M-1 ou TEM-167) [143].

Dans notre étude réalisée sur des souches d'*E. coli* isolées au CHU de Constantine (Est algérien), nous avons rapporté la détection du gène *armA* chez deux souches productrices de carbapénémases de type OXA-48, AmpC de type CMY-16 et la B-lactamase TEM-1.

Notre étude présente le premier rapport de la première description des souches d'*E. coli* co-exprimant à la fois ArmA, OXA-48, CMY-16 et TEM-1. La résistance aux B-lactamines et aux aminosides par production de BLSE, des céphalosporinases, des carbapénémases et les méthylases de l'ARNr 16S entraîne l'émergence de bactéries multi-résistantes BMR, limitant ainsi les possibilités thérapeutiques.

## **11. *Escherichia coli* ST131 et phylogroupes**

Les résultats de la PCR spécifique ciblant le gène *papB* selon la méthode de Clermont *et al.*, 2009 pour la détection du clone ST131 et ceux de la PCR des phylogroupes selon la méthode révisée de Clermont *et al.*, 2013 chez les souches d'*E. coli* BLSE analysées ont révélé que parmi les 42 souches d'*E. coli* BLSE étudiées, 16 souches productrices de BLSE CTX-M-15 étaient positives pour le ST131 et qu'elles appartiennent au phylogroupe B2. Alors que les résultats pour les autres souches restantes étaient ST131 négatif selon la distribution représentée dans le tableau 22.



**Tableau 22** : Groupes phylogénétiques et ST131 chez des souches d'*E. coli* BLSE

Groupes Phylogén- étiques	B2		A	B1		D		C	F	D
	CTX M-15	CTX M-15	CTX M-15	CTX M-1	SH V-2	CTX M-15	CTX M-15	CTX M-15	CTX M-15	TEM-1
<b>B- lactamase s</b>										
<b>ST131</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nombre</b>	16	2	2	5	1	8	1	3	2	2

La prévalence des souches d'*E. coli* BLSE ST131 dans notre étude est 38.09 % (16 souches parmi les 42 souches d'*E. coli* étudiées), cette fréquence est supérieure à celle observée en Espagne et inférieure à celle trouvée au Royaume-Uni selon des études précédentes qui ont rapporté qu'en Europe, parmi les souches cliniques productrices de BLSE isolées entre 2006 et 2011, la prévalence des *E. coli* ST131 variait de 23% en Espagne à 66% au Royaume-Uni [218, 219, 220]. Dans les autres populations du monde, la prévalence du clone ST131 semble être également élevée. Aux Etats-Unis, en 2009-2010, 54% des *E. coli* producteurs de BLSE étaient des *E. coli* ST131 (206). Au Canada et au Japon, les chiffres sont voisins de ceux observés aux Etats-Unis avec une prévalence de 50 % et 52% respectivement [221, 222]. Des prévalences plus importantes ont été observées aussi, en 2009, en Inde, 70% des isolats producteurs de BLSE appartenaient au clone ST131 [223]. A Calgary (Canada), la prévalence du clone ST131 au sein des *E. coli* BLSE a augmenté brutalement à partir de 2007 pour atteindre les 78% en 2010 [224].

D'après nos résultats, 2.38% des souches d'*E. coli* BLSE ST131 provenant des prélèvements en ambulatoire par contre 97.62% isolées à partir des prélèvements hospitaliers. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Banerjee et *al.* qui ont montré que les *E. coli* ST131 prédominaient dans les infections acquises en milieu hospitalier, impliquant des isolats résistants, à l'inverse, les autres lignées comme (ST95, ST73, ST127 et ST69) étaient plus fréquentes dans les infections communautaires causées par des *E. coli* sensibles aux antimicrobiens [225].

Depuis sa première description en 2008 sur 3 continents (Europe, Amérique du Nord, Asie), le clone *E. coli* ST131 a été rapporté dans toutes les régions du monde [226]. Les premiers isolats d'*E. coli* du clone ST131 étaient caractérisés par la production de la BLSE CTXM-15 et la majorité des études se sont basées sur cette caractéristique pour établir la prévalence du clone [227]. Dans notre étude, toutes les souches d'*E. coli* ST131 étaient productrices de BLSE type CTX-M-15, conformément à la littérature, qui a montré que la production de l'enzyme CTX-M-15 était une caractéristique commune aux premiers isolats de *E. coli* ST131 identifiés en 2008 [227] et que la BLSE CTX-M-15 reste l'enzyme la plus identifiée chez *E. coli* ST131 au niveau mondial [228].

Une étude en 2004 a rapporté que les souches d'*E. coli* commensales semblent faire partie préférentiellement du phylogroupe A. Les souches virulentes d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (Ex-PEC) semblent majoritairement associées au phylogroupe B2 et en minorité au phylogroupe D. Les souches responsables de diarrhées chroniques légères telles que les EPEC ne semblent pas être classées spécifiquement parmi un phylogroupe bien que certaines études les associent préférentiellement au phylogroupe B1 [229]. Les souches d'*E. coli* pathogènes productrices de toxines comme les EHEC se répartissent préférentiellement entre les phylogroupes A et B1 [230, 231]. Nos résultats montrent que 16 (38.09 %) souches d'*E. coli* BLSE ST131 appartiennent au phylogroupe B2, conformément aux résultats rapportés par d'autres études précédentes qui ont montré que les *E. coli* ST131 sont à l'origine de la majorité des infections et qu'elles appartiennent au groupe phylogénétique B2 [227, 232].

# Conclusion

---

## Conclusion

La résistance aux antibiotiques est devenue un véritable problème de sante publique en Algérie et à travers le monde, avec l'émergence et la diffusion de bactéries multirésistantes. Le présent travail, avait pour objectif général de caractériser les gènes de résistance aux différentes familles d'antibiotiques y compris les gènes responsables de la résistance aux aminosides codant pour les méthylases de l'ARNr 16S chez des souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE isolées au CHU de Constantine. Cette étude, a porté sur des souches d'*E. coli* isolées de divers échantillons biologiques provenant de divers services hospitaliers et des prélèvements en ambulatoire.

Différentes études de surveillance mondiales et nationales ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *E. coli*. Celle-ci restreint considérablement le choix thérapeutique dans le traitement des infections sévères dues à ces bactéries d'autant plus que des gènes de résistance à d'autres antibiotiques sont souvent associés (aminosides et fluoroquinolones).

Notre étude a révélé une grande diversité de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines avec production de BLSE, des céphalosporinases, et des carbapénémases avec également des résistances aux aminosides. La recherche moléculaire du support génétique de ces résistances à révélé une diversité génétique des gènes qui codent pour les BLSE avec dominance du gène codant la BLSE CTX-M-15, confirmant la grande propagation de cette enzyme à l'échelle mondiale. Quant à la résistance aux aminosides, nous avons détecté pour la première fois l'émergence de souches d'*E. coli* productrices du gène *armA* au CHU de Constantine qui confère la résistance à tous les aminosides cliniquement utilisé au niveau du CHU de Constantine, rendant ainsi les options du traitement des infections causées par ces bactéries plus restreintes, de plus ces gènes ont été détectés en association avec des gènes codant des AmpC de type *CMY-16* et des carbapénémases type OXA-48.

En définitive, nos résultats ayant révélé que l'efficacité des antibiotiques décroît au fil du temps, les bactéries additionnent des résistances à diverses familles d'antibiotiques et deviennent des multirésistantes BMR.

La présente étude montre aussi que la dissémination des gènes de résistance *bla*CTX-15 au niveau du CHU de Constantine, est liée aussi à la circulation du clone *E. coli* ST131, clone caractérisés par la production de la BLSE CTXM-15 représentant les souches responsables des infections extra-intestinales.

La dissémination des souches d'*E. coli* productrices de BLSE et la résistance aux autres classes d'antibiotiques, constituent un problème de santé majeur au niveau du CHU de Constantine. Cette multirésistance ne régresse pas facilement, ce qui conduit aux risques d'impasses thérapeutiques, surtout que les carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours contre les entérobactéries multirésistantes, commencent à perdre leur efficacité. Ce qui induirait par la suite la sélection des souches résistantes aux carbapénèmes. Le contrôle du réservoir de cette résistance est désormais un objectif majeur de santé publique, en particulier la mise au point des tests rapides permettant la détection des souches productrices de carbapénèmases contribue à éviter leur dissémination nosocomiale.

Face à cette situation, il est donc nécessaire d'adopter en urgence un certain nombre de mesures et de surveiller l'émergence de ces bactéries multirésistantes dans les hôpitaux algériens, pour éviter l'écllosion d'épidémies hospitalières. Aussi, l'amélioration de la microbiologie des laboratoires est également essentielle. Cette dernière doit être accélérée, et l'identification des agents pathogènes et leur résistance aux antibiotiques en heures plutôt qu'en jours.

Des méthodes d'identification rapides existent, y compris la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et des techniques de Biologie moléculaire telle que l'amplification par PCR pour rechercher les gènes de résistance. Parallèlement, une bonne pratique d'hygiène avec la formation et la sensibilisation du personnel soignant et l'isolement des patients porteurs de souches multirésistantes pourraient arrêter les épidémies d'infections nosocomiales causées par ces bactéries dans les hôpitaux algériens. Un tel développement permettrait de réduire les coûts des longs séjours d'hospitalisation et d'antibiothérapie et de limiter la dissémination de bactéries multirésistantes.

Cette étude ouvre des perspectives de recherche, et il s'agit de :

- Caractériser les plasmides porteurs des gènes *blaCTX-M-15* impliqués dans leur dissémination.
- Caractériser les gènes de résistance impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones
- Etudier la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* en milieu communautaire ;
- Etudier et rechercher les gènes de virulence des souches d'*E. coli* multirésistantes ;
- Réaliser des enquêtes sur la consommation des antibiotiques dans les hôpitaux algériens.

# **Références bibliographiques**

1. Livermore D.M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **8** :557-584.
2. Gassama A.S. (2004). Etude du rôle des intégrons dans la multi résistance aux antibiotiques des bactéries enteropathogènes isolées en Afrique Sub-saharienne, thèse de doctorat, Université de Limoges, France. 97 p.
3. Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Arlet G., Bakour R. (2010). Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux quinolones d'*Enterobacter* dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. **4** : 24 .
4. Cantón R., Coque TM. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. **9**: 466–475.
5. Coque TM., Baquero F., Canton R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. **13**: 19044.
6. Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. **17**: 1791–8.
7. Nordmann P., Poirel L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. **20**: 821–830.
8. Amazion K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L., *et al.* (2010). Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterr Health J*. **16**: 1070-1078.
9. Brigante G., Luzzaro F., Perilli M., Lombardi G., Coli A., Rossolini G.M., *et al.* (2005). Evolution of CTX-M-type betalactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents*. **25**: 157–62.
10. Hidalgo L., Hopkins K.L., Gutierrez B., Ovejero C.M., Shukla S., Douthwaite S., *et al.* 2013. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **68** : 1543-1550.
11. Johnson JR., Johnston B., Clabots C., Kuskowski MA., Castanheira M. (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis*. **51**: 286–294.

12. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* **2**: 123-40.
13. Ari R., Sezonov G. (2008) .Les organismes modèles : biologie et génétique d'*Escherichia coli*. Belin, Paris. P11.
14. Grimont, P. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect.* **17** : 6-10.
15. Soumaila G.A. (2012).Caractérisation phénotypique et génétique des *Escirichia coli* isolées des cas de colibacilloses aviaires au Sénégal. Thèse de doctorat. Université cheikh anta diop de Dakar. 79 P.
16. Baraduc R., Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Jallat C., Joly B., Livrelly D. (2000). *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA: 1115-1126.
17. Cristian C. (2008). Microbiologie hygiène Bases microbiologiques de la diététique. Lavoisier, Paris. P 79.
18. Tenailon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* **8**: 207-17.
19. Pantel A. (2015). Multi résistance des entérobactéries aux antibiotiques, Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131.Thèse de doctorat. Université de Montpellier .244 p.
20. Prodhomme A. (2008). Sensibilité diminuée d'*Escherichia coli* aux céphalosporines de 3ème génération : étude génétique et corrélation avec l'utilisation des  $\beta$ -lactamines en thérapeutique. Thèse de doctorat. Université de Nantes faculté de pharmacie. 90 P.
21. Darcan C., Ozkanca R., Idil O., Flint KP. (2009). Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Pol J Microbiol.* 58(4): 307-317.
22. Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell RR., Cormier M. (1996). Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol.* **62(12)**: 4621-4626.
23. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver JD., Faucher SP. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* **5**: 258.



24. Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol.* **9(9)**: 2274–2288.
25. Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ. (2006). Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Appl Environ Microbiol.* **72(1)**: 612–621.
26. Power ML., Littlefield-Wyer J., Gordon DM., Veal DA., Slade MB. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol.* **7(5)**: 631–640.
27. Tymensen LD., Pyrdok F., Coles D., Koning W., McAllister TA., Jokinen CC., Dowd SE., Neumann NF. (2015). Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals genetically diverse naturalized population. *J Appl Microbiol.* **119(1)**: 263–277.
28. Zhang Q., Yan T. (2012). Correlation of intracellular trehalose concentration with desiccation resistance of soil *Escherichia coli* populations. *Appl Environ Microbiol.* **78(20)**: 7407–7413.
29. Hart T., Shears P. (1999). Atlas de poche de microbiologie. Flammarion Médecine-Science, Paris. P 118.
30. Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). Bactériologie clinique. 2ème édition Marketing, Paris. 148-280p.
31. Bidet P., Bingen E. (2011). Bactériologie Médicale. Elsevier Masson SAS : 2ème édition. 331-427 p.
32. Joly B., Reynaud A. (2007). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Paris : Tec. 3-182 p.
33. Mainil J. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann Med Vet.* **147**:105–126.
34. Orskov f O. I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.* **14**: 43-112.
35. Beutin L. (1999). *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.* **30**: 285-298.

36. Payros D. 2012. Étude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches d'*Escherichia coli* génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale. Thèse de Doctorat. Toulouse : Université Paul Sabatier.
37. Lane M.C., Lockett V., Monterosso G., Lamphier D., Weinert J., Hebel J. R., *et al.* (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun.* **73**: 7644-56.
38. Lane M. C., Mobley H. L. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **72**:19-25.
39. Machado J., Grimont F., Grimont P. A. (1998). Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. *Res Microbiol.* **149**:119-35.
40. Posl P., Linermas P., Mainil J., Deprez P. (1998). Production des vérocytotoxine par *Escherichia coli* du porc. *Annales de médecine vétérinaire.* **38** : 133 .
41. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 4555-4558.
42. Jaureguy F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., *et al.* (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics.* **9**(1): 560.
43. Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013). The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology reports.* **5** (1) : 58-65.
44. Tenailon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* **8**(3): 207.
45. Reid SD., Herbelin CJ., Bumbaugh AC., Selander RK., Whittam TS. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature.* **40**: 64.
46. Wang L., Wakushima M., Aota T., Yoshida Y., Kita T., Maehara T., *et al.* (2013). Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl Environ Microbiol.* **79**(4): 1232–1240.

47. Badouei MA., Jajarmi M., Mirsalehian A. (2015). Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **38**: 15–20.
48. Martins FH., Guth BEC., Piazza RM., Leao S.C., Ludovico A., Ludovico M.S., *et al.* (2015). Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, Southern Brazil. *Vet Microbiol.* **175(1)**: 150–156.
49. Girardeau JP., Dalmasso A., Bertin Y., Ducrot C., Bord S., Livrelli V., *et al.* (2005). Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* **43(12)**: 6098–6107.
50. Croxen M., Finlay B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **8**: 26–38.
51. Gillespie S., Hawkey PM. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. London: John Wiley & Sons. 621 p.
52. Johnson J.R., Russo T.A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* **295**: 383-404.
53. Mokady D., Gophna U., Ron E.Z. (2005). Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* **43**: 66-73.
54. Darfeuille-Michaud A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol.* **292**: 185-93.
55. Martinez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., Lopez, C., Alonso, M.P., Bonacorsi, S., *et al.* (2009) Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **47**: 3968-79.
56. Mora A., Herrera A., Lopez C., Dahbi G., Mamani R., Pita J.M., *et al.* (2011) Characteristics of the Shiga-toxin producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol.* **14**: 121-41.
57. Levy SB., Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* **10** : 122-129.

58. Bentley R., Bennett J.W. (2003). What is an Antibiotic?. *Advances in applied microbiology*. **52**: 303-331.
59. Walsh C. (2003). Antibiotics: Actions. Resistance. *ASM Press*. 335.
60. Bosgiraud C. (2003). Microbiologie générale et santé. Paris ESK. 278p.
61. Prescott L.M., Klein D.A., Harley J.P. (2010). Microbiologie. 3ème édition De Boeck. 1088 p.
62. Bert F., Lambert-Zechovsky N. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques*. **2**: 195-201.
63. Robin F., Gibold L., Bonnet R. (2012). Intrinsic or acquired resistant to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae*: How to identify them in clinical practice. *Rev Francoph Lab*. **445**: 47-58.
64. Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004). Bêtalactamines. *EMC-Mal Infect*. **1**: 129–202.
65. Bonomo A.R. (2006).  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitors. Antibiotic Therapy for Geriatric Patients. *Taylor & Francis*. 141-53.
66. Ruppé E. (2010). Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. *Antibiotiques*. **12**: 3-16.
67. Nordmann P., Carrer A. (2010). Carbapenemases in enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*. **17**: 154-62.
68. Bonnet R. (2006). B-lactamines et entérobactéries. AntibioGramme. Paris. ESKA : 2ème édition. 141-162.
69. Philippon A. (2008). Entérobactéries des bêtalactamines. Elsevier Masson SAS, Paris, Biologie clinique. 1-18.
70. Comte D., Petitpierre S., Bart PA., Spertini F. (2012). Allergie aux  $\beta$ -lactamines. *Rev Med Suisse*. **(8)**: 836-842.
71. Wachino J., Arakawa Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat*. **15**: 133-148.

72. Nguyen J.C., Lambert T. (2012). Interpretative analysis of aminoglycoside resistance by the antibiogram. *Rev Francoph Lab.* **445**: 75-77.
73. Cundliffe E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu.Rev.Microbiol.* **43**:207-233.
74. Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R., Falagas M.E. (2009). Do we still need the aminoglycosides?. *Int J Antimicrob Agents.* **33**: 201-205.
75. Vakulenko S.B., Mobashery S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* **16**: 430-50.
76. Leshner G. Y., Froelich E. J., Gruett M. D., Bailey J. H., Brundage P. (1962). 1,8-Naphthyridine Derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J.Med.Pharm.Chem.* **91**:1063-1065.
77. Zhanel G.G., Hoban D., Schurek K., Karlowsky J.A. (2004). Role of efflux mechanisms on fluoroquinolones resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents.* **24**: 529-35.
78. Soussy C.J. (2006) .Quinolones et bactéries à GRAM négatif. Antibiogramme. *Paris ESKA* . **21**: 261-277.
79. Cattoir V. (2012). Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Rev Francoph Lab.* **445**: 79-87.
80. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X. (2009). Quinolones: action and resistance updated. *Curr.Top.Med.Chem.* **9**: 981-998.
81. Lewin C. S., Howard B. M., Smith J. T. (1991). Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J.Med.Microbiol.* **34**:19-22.
82. Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 385-92.
83. Andriole V.T. (2000). The Quinolones. *Elsevier Science.* 517p.

84. Vora S., Auckenthaler R. (2009). Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique. *Rev Med Suisse*. **5**: 1991-1994.
85. Abraham E.P., Chain E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. **146**: 837.
86. Ambler R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **289**: 321-31.
87. Bush K., Jacoby G.A. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**: 969-76.
88. Jacoby G.A., Munoz-Price L.S. (2005). The new  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med*. **352**: 380-391.
89. Bonnet R. (2012). B-lactamines et entérobactéries. Antibiogramme. *Paris ESKA*. **16**: 165-188.
90. Crémet L., Caroff N., Giraudeau C., Dauvergne S., Lepelletier D., Reynaud A., *et al.* (2010). Occurrence of ST23 complex phylogroup A *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum AmpC beta-lactamase in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2216-8.
91. Nordmann P., Mammeri H. (2007). Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol*. **2**: 297-307.
92. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**: 1-11.
93. Jacoby G.A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. **22**: 161-82.
94. Philippon A. (2013). Extended-spectrum beta-lactamases. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. **28**: 287-296.
95. Paterson D.L., Bonomo R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. **18**: 657-686.
96. Geser N., Stephan R., Hachler H. (2012). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res*. **8**: 21.

97. Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., *et al.* (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **14**: 144–153.
98. Bradford P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14**: 933-951.
99. Haeggman S., Löfdahl S., Paauw A., Verhoef J., Brisse S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2400-2408.
100. Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev.Infect.Dis.* **10**: 867-878.
101. Ambler R.P., Coulson A.F.W., Frère J.M., Ghuysen J.M., Joris B., Forsman M., *et al.* (1991). A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.* **276**: 269-270.
102. Bradford P.A. (1999). Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *blaSHV* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2960-2963.
103. Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1–14.
104. Rossolini G.M., D'Andrea M.M., Mugnaioli C. (2008). The spread of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **14**: 33-41.
105. Philippon A. (2013). Extended-spectrum beta-lactamases. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* **28**: 287-96.
106. Iabadene H., Dallenne C., Messai Y., Geneste D., Bakour, R., Arlet G. (2009) Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 4043-4044.
107. Batah R., Loucif L., Olaitan A.O., Boutefnouchet N., Allag H., Rolain, J.M. (2015). Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels

- of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist.* **21**: 470–6.
108. Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerging Infect Dis.* **17**: 1791–8.
109. Queenan A.M., Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **20**: 440–58.
110. Partridge S. R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol.Rev.* **33**:757-784.
111. Magnet S., Blanchard J.S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* **105**: 477-98.
112. Galimand M., Courvalin P., Lambert T. (2003). Plasmid-mediated highlevel resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 2565-71.
113. Deng Y. T., Zeng Z. L., Tian W., Yang T., Liu J. H. (2013). Prevalence and characteristics of rmtB and qepA in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol.* **4**:198.
114. Wachino J., Arakawa Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist.Updat.* **15**:133-148.
115. Seng P., Rolain J. M, Fournier PE., Drancourt M., Raoult D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future.Microbiol.* **5**:1733-1754
116. Seng P., Rolain JM., Fournier PE., La Scola B., Drancourt M. (2010). MALDI-TOF-Mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future. Microbiol.* **5**: 1733–1754.
117. Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C., Bogaerts P. (2007). Evaluation of a new selective chromogenic medium for detection of Extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae . *J. Clin Microbiol.* **45**: 501-505.
118. Sirot J. (1996). Detection of extend-spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. *Clin Microbiol Infect.* **2**: 35–9.



119. Bakour S., Garcia V., Loucif L., Brunel J-M., Gharout-Sait A., Touati A., *et al.* (2015). Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New microbes and new infect.* **10(7)**: 89-93.
120. Huang TD., Poirel L., Bogaerts P., Berhin C., Nordmann P., Glupczynski Y. (2014). Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother.* **69(2)**: 445-50.
121. Bakour S., Olaitan AO., Ammari H., Touati A., Saoudi S., Rolain JM *et al.* (2015). Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microb. Drug Resist.* **21(3)**: 279-285.
122. Renu G., Rajeev T., Smita S. (2010). Existence of Metallo beta lactamases in carbapenem susceptible gram negative bacilli: a cause for concern. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* **4(4)**: 2679-84.
123. Glupczynski Y., Evrard S., Ote I., Mertens P., Huang T-D., Leclipteux T., *et al.* (2016). Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* **71(5)**: 1217- 22.
124. Bogaerts P., Rezende de Castro R., De Mendonça R., Huang TD., Denis O., Glupczynski Y. (2013). Validation of carbapenemase and extended-spectrum beta-lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *J Antimicrob Chemother.* **68**: 1576-1582.
125. Clermont O., Dhanji H., Upton M., Gibreel T., Fox A., Boyd D., *et al.* (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15 producing strains. *J Antimicrob Chemother.* **64**: 274-277.
126. Clermont O., Christenson JK., Denamur E., Gordon DM. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol.* **5**: 58-65.
127. Hendrick M., Kasamba E., Mahuridi A., Nlandu R., Narufumi S., Ntambue A. (2017). L'incidence des infections nosocomiales urinaires et des sites opératoires dans la maternité de

l'Hôpital général de référence de Katuba à Lubumbashi en république démocratique du Congo. *The Pan African Medical Journal*. **28** : 57.

128. Meftah N., Triki M., Hdidane Y., Cherif Y., Yangui F., Masmoudi M., et al. (2020). Particularités de l'infection nosocomiale dans un service de pneumologie. *Revue des maladies respiratoires actualités*. **12** : 243-244.

129. Mbutshu HL., Ntambwe AM., Ngatu RN., Sukanuma N., Wembonyama SO., Kabyla I. (2013). Gestion des déchets d'activités de soins et entretien des locaux à l'hôpital de référence Jason Sendwe de Lubumbashi, République Démocratique du Congo. *Hygiènes*. **21(3)**: 159–162.

130. Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacillus à Gram negative en Algérie. *Pathologie Biologie*. **62** : 169-178.

131. Paterson DL. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. **34**: 20–8.

132. Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*. **113**: 14–9.

133. Nouetchognou J.S., Ateudjieu J., Jemea B., Mesumbe E.N., Mbanya, D. (2016). Surveillance of nosocomial infections in the Yaounde University Teaching Hospital, Cameroon. *BMC Res Notes*. **9**: 505.

134. Agabou A., Pantel A., Ouchenane Z., Lezzar N., Khemissi S., Satta D., et al. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **33**: 1641-6.

135. Sbiti M., Lahmadi k., louzi L. (2017). Profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de bêta-lactamases à spectre élargi. *The Pan African Medical Journal*. **28**: 29.

136. Riegel P. (2003). Aspect bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et maladies infectieuses*. **33**: 255-265.

137. Larabi K., Masmoudi A., Fendri C. (2003). Bacteriological and susceptibility study of 1930 strains isolated from UTIs in a Tunis university hospital. *Med Mal Infect*. **33**: 348–52.

138. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., et al. (2003). Microbiologie. 2ème édition. Boeck Université. 1099 p.
139. Descy J., Meex C., Melin P., Hayette M.P., Huynen P., De Mol P. (2010). Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Rev Med Liège*. **65** : 29-34.
140. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., et al. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. **48(4)**:1169-75.
141. Carbonnelle E., Grohs P., Jacquier H., Day N., Tenza S., Dewailly A., et al. (2012). Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J Microbiol Methods*. **89(2)**: 133-6.
142. Richter SS., Sercia L., Branda JA., Burnham CA., Bythrow M., Ferraro MJ., et al. (2013). Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **32(12)**:1571-8.
143. Ayad A, Drissi M, de Curraize C, Dupont C, Hartmann A, Solanas S, et al. (2016). Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Front Microbiol*. **7**: 1409.
144. Prère M.-F., Licznar P., Decramer S., Fayet O. (2004). *Escherichia coli* des infections urinaires et pyélonéphrites aiguës en pédiatrie : 1% des souches sont résistantes à certaines céphalosporines de 3e génération. *Pathol Biol*. **52** : 497– 500.
145. El Bouamri MC., Arsalane L., Kamouni Y., Yahyaoui H., Bennouar N., Berraha M. et al. (2014). Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes et conséquences thérapeutiques. *Prog Urol*. **24(16)**: 1058-62.
146. Nadmi H., Elotmani F., Talmi M., Zerouali K., Perrier-Gros-Claude JD., Timinouni M. (2010). Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). *Med Mal Infect*. **40**: 303-5.

147. Ben Haj Khalifa A., Khedher M. (2010). Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries uropathogènes à l'hôpital universitaire de Tahar Sfar de Mahdia. *Rev Tun Infectiol.* **4(2)**: 57-61.
148. Gonsu Kanga H., Nzengang R., Toukam M., Sando Z., Koulla Shiro S. (2014). Phénotypes de résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables des infections urinaires communautaires dans la ville de Yaoundé (Cameroun). *AJPM.* **3**:1-4.
149. El Bouamri MC., Arsalane L., Kamouni Y., Yahyaoui H., Bennouar N., Berraha M., *et al.* (2014). Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes et conséquences thérapeutiques. *Prog Uro.* **24(16)**: 58–62.
150. Abid F., Boutefnouchet N., Dekhil M., Bouzerna N. (2007). *Klebsiella pneumoniae* productrices de beta–lactamases a spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba, Algérie. *Scientific Study & Research.* **2** : 199-214.
151. Nordmann P., Poirel L., Dartet L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* **18**: 1503-1507.
152. Vallée M., Bey E., Le Goux C., Cattoir V., Gaborit B.J. (2018). Bacterial resistances: What should the urologist know. *Truc et Astuce.* **28**: 103-106.
153. Wareham D. W., Abdul Momin M. H. F. (2017). Rapid Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Evaluation of the Resist-3 O.K.N. (OXA-48, KPC, NDM) Lateral Flow Multiplexed Assay. *Journal of Clinical Microbiology.* **55(4)**: 1223-1225.
154. Vodovar D., Marcadé G., Raskine L., Malissin I., Mégarbane B. (2013). *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamase: Epidemiology, risk factors, and prevention. *Rev Med Interne.* **34**: 687-93.
155. Severin J.A., Mertaniasih N.M., Kuntaman K., Lestari E.S., Purwanta M., Lemmens-Den Toom N., *et al.* (2010). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. *J Antimicrob Chemother.* **65(3)**: 465-469.
156. Duval V., Maiga I., Maiga A., Guillard T., Brasme L., Forte D., *et al.* (2009). High prevalence of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bamako, Mali. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53(11)**: 4957-4958.

157. Bertrand X., Hocquet D., Boisson K., Siebor E., Plesiat P., Talon D. (2003). Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents*. **22**: 128-33.
158. Lagha N. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 105p.
159. Bermudes H., Arpin C., Jude F., Elharrif Z., Bebear C., Quentin C. (1997). Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteria* in a French hospital. *Klebsiella pneumoniae* Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **16**: 523-529.
160. Canton R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eur Soc Clin Microbiol Infect*. **14**: 144–153.
161. Poirier C., Dinh A., Salomon J., Grall N., Andremont A., Bernard L. (2016). Prevention of urinary tract infections by antibiotic cycling in spinal cord injury patients and low emergence of multidrug resistant bacteria. *Med Mal Infect*. **46(6)**: 294-9.
162. Arpin C., Dubois V., Coulange L., Andre C., Fischer I., Noury P., *et al.* (2003). Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteria-ceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*. **47(11)**: 3506-14.
163. Rodriguez-Bano J., Lopez-Cerero L., Navarro M.D., Diaz de Alba P., Pascual A. (2008). Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. **62(5)**: 1142–1149.
164. Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTXM enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:1–14.
165. Ramdani-Bougoussa N., Mendonca N., Leitao J., Ferreira E., Tazir M., Canica M. (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol*. **44**: 4584-86.
166. Touati A., Medboua C., Touati D., Denine R., Brasme L., de Champs, C. (2012). CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol*. **3**: 181-5.

167. Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Decré D., Genel N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., Drissi M. (2013). Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb Drug Resist.* **19**: 185–90.
168. Yahiaoui M., Robin F., Bakour R., Hamidi M., Bonnet R., Messai Y. (2015). Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist.* **21**: 516-26.
169. Medboua-Benbalagh C., Touati A., Kermas R., Gharout-Sait A., Brasme L., Mezhoud H., *et al.* (2017). Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Strains Is Associated with Worse Outcome in Patients Hospitalized in the Pediatric Oncology Unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microb Drug Resist.* **23(6)**: 757-763.
170. Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A., Ben Moussa M. (2014). Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Méd.mal. infect.* **44**: 400-4.
171. Girlich D., Bouihat N., Poirel L., Benouda A., Nordmann P. (2014). High rate of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect.* **20**: 350-4.
172. Belmahdi M., Bakour S., Al Bayssari C., Touati A., Rolain J.M. (2016). Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist.* **6**: 108-12.
173. Yousfi M., Mairi A., Touati A., Hassissene L., Brasme L., Guillard T., *et al.* (2016). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J Infect Chemother.* **22**: 431-5.
174. Yahiaoui M., Robin F., Bakour R., Hamidi M., Bonnet R., Messai Y. (2015). Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist.* **21**: 516-26.
175. Cantón R., Coque T.M. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* **9**: 466-75.

176. Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., *et al.* (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **59**: 165-74.
177. Naas T., Philippon L., Poirel L., Ronco E., Nordmann P. (1999). An SHV-Derived Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(5): 1281–1284.
178. Hanson ND. (2003). AmpC  $\beta$ -lactamases: what do we need to know for the Future. *J Antimicrob Chemother.* **52**: 2–4.
179. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 1–11.
180. Gharout-Sait A., Touati A., Guillard T., Brasme L., de Champs C. (2015). Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *braz j infect dis.* **19**: 187–95.
181. Yousfi M., Touati A., Mairi A., Brasme L., Gharout-Sait A., Guillard T., *et al.* (2016). Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microb Drug Resist.* **22**: 342-6.
182. Verdet C., Benzarara Y., Gautier V., Adam O., Ould-Hocine Z., Arlet G. (2006). Emergence of DHA-1 producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 607-617.
183. Yilmaz NO., Agus N., Bozcal E., Oner O., Uzel A. (2013). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Med Microbiol.* **31**: 53-59.
184. Mnif B., Ktari S., Chaari A., Medhioub F., Rhimi F., Bouaziz M., *et al.* (2013). Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates carrying blaOXA-48, blaPER-1, blaCMY-4 and qnrA6 in a Tunisian hospital. *J Antimicrob Chemother.* **68**: 329-332.
185. D'Andrea MM., Nucleo E., Luzzaro F., Giani T., Migliavacca R., Vailati F., *et al.* (2006). CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in



- multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 618-624.
186. D'Andrea MM., Literacka E., Zioga A., Giani T., Baraniak A., Fiett J., *et al.* (2011). Evolution and spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**: 2735-2742.
187. Migliavacca R., Migliavacca A., Nucleo E., Ciaponi A., Spalla M., De Luca C., *et al.* (2007). Molecular epidemiology of ESBL producing *Proteus mirabilis* isolates from a long-term care and rehabilitation facility in Italy. *New Microbiol.* **30**: 362-366.
188. Bedenić B., Firis N., Elvedić-Gašparović V., Krilanović M., Matanović K., Štimac I., *et al.* (2016). Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a longterm care facility in Croatia. *Wiener Klin Wochenschrift.* **128**: 404-413.
189. Chérif T., Saidani M., Decré D., Boutiba-Ben Boubaker I., Arlet G. (2016). Cooccurrence of multiple AmpC lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**: 44-51.
190. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* **24**: 98-56.
191. Kempf M., Rolain JM. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents.* **39(2)**:105-14.
192. Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* **17(10)**:1791-8.
193. Carrer A., Poirel L., Yilmaz M., *et al.* (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* **54(3)**: 1369-73.
194. Poirel L., Potron A., Nordmann P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* **67(7)**: 1597-606.
195. Carrer A., Poirel L., Eraksoy H., Cagatay AA., Badur S., Nordmann P. (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(8)**: 2950-4.



196. Poirel L., Carbonnelle E., Bernabeu S., Gutmann L., Rotimi V., Nordmann P. (2012). Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J Antimicrob Chemother.* **67(8)**:2051-2.
197. Datta P., Gupta V., Garg S., Chander J. (2012). Phenotypic method for differentiation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: study from north India. *Indian J Pathol Microbiol.* **55(3)**:357-60.
198. Saïdani M., Hammami S., Kammoun A., Slim A., Boutiba-Ben Boubaker I. (2012). Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Tunisia. *J Med Microbiol.* **61**:1746–1749.
199. Mesli E., Berrazeg M., Drissi M., Bekkhoucha SN., Rolain JM. (2013). Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis.* **17(9)**: 739-743.
200. Touati M., Diene SM., Racherache A., Dekhil M., Djahoudi A., Rolain JM. (2012). Emergence of bla<sub>oxa</sub>-23 and bla<sub>oxa</sub>-58 carbapenemase-encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University Hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* **40(1)**:89-91.
201. Bakour S., Kempf M., Touati A., *et al.* (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J Med Microbiol.* **61(9)**:1341-3.
202. Hammerum AM., Larsen AR., Hansen F., Justesen US., Friis-Møller A., Lemming LE., *et al.* (2012). Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* **40**:191–192.
203. Giani T., Conte V., Di Pilato V., Aschbacher R., Weber C., Larcher C., *et al.* (2012). *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**:2211–2213.
204. Magnet S., Blanchard JS. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* **105(2)**:477-98.
205. Krishnappa L.G., John J., Marie M.A.M., Gopalkrishnan S., Pradeep C.S., Rani S.R.B. (2012). Detection of pan-amino glycoside resistant Gram negative bacteria using a molecular method. *South Asian J Exp Biol.* **2**: 256-8.

206. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Shibata N., Kato H., Shibayama K., *et al.* (2007). 16S rRNA methylase-producing gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infect Dis.* **13**: 642-6.
207. Berçot B., Poirel L., Nordmann P. (2008). Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 4526-7.
208. Berçot B., Poirel L., Ozdamar M., Hakko E., Turkoglu S., Nordman P. (2010). Low prevalence of 16S méthylases among extended-spectrum-b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother.* **65**: 797-798.
209. Wu Q., Zhang Y., Han L., Sun J., Ni Y. (2009). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 271-2.
210. Bogaerts P., Galimand M., Bauraing C., Deplano A., Vanhoof R., De MR., *et al.* (2007). Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* **59**:459–64.
211. Naas T., Bentchouala C., Lima S., Lezzar A., Smati F., Scheftel JM., *et al.* (2009). Plasmidmediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta lactamaseproducing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J Antimicrob Chemother.* **64**: 866–8.
212. Naas T., Bentchouala C., Cuzon G., Yaou S., Lezzar A., Smati F., *et al.* (2011). Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* **38**:135–9.
213. Bouzidi N., Aoun L., Dekhil M., Granier SA., Poirel L., Brisabois A., *et al.* (2011). Cooccurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhia` *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* **66**: 2180–1.
214. Bakour S., Touati A., Bachiri T., Sahli F., Tiouit D., Naim M., *et al.* (2014). First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-β-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother.* **20**: 696–701.

215. Belbel Z., Chettibi H., Dekhil M., Ladjama A., Nedjai S., Rolain J.M. (2014). Outbreak of an ArmA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist.* **20**: 310-5.
216. Batah R., Loucif L., Olaitan A.O., Boutefnouchet N., Allag H., Rolain J.M. (2015). Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist.* **21**: 470–6.
217. Khennouchi N.C., Loucif L., Boutefnouchet N., Alleg H., and Rolain J.M. (2015). MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase- and *armA* methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**: 6477–83.
218. Blanco M., Alonso MP., Nicolas-Chanoine M-H., Dahbi G., Mora A., *et al.* (2009). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **63**:1135–41.
219. Seiffert SN., Hilty M., Kronenberg A., Droz S., Perreten V., Endimiani A. (2013). Extended spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in community, specialized outpatient clinic and hospital settings in Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* **68**: 2249–2254.
220. Olesen B., Hansen DS., Nilsson F., Frimodt-Møller J., Leihof RF., Struve C., *et al.* (2013). Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *J Clin Microbiol.* **51**:1779–1785.
221. Simner PJ., Zhanel GG., Pitout J., Tailor F., McCracken M., Mulvey MR., *et al.* (2011). Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: Results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **69**:326–334.
222. Yano H., Uemura M., Endo S., Kanamori H., Inomata S., Kakuta R., *et al.* (2013). Molecular Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$  Lactamases in Clinical Isolates from *Escherichia coli* at a Japanese Tertiary Hospital. *PLoS One.* **8**:1–6.

223. Hussain A., Ewers C., Nandanwar N., Guenther S., Jadhav S., Wieler LH., *et al.* (2012). Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: Genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 6358–6365.
224. Peirano G., Van Der Bij AK., Gregson DB., Pitout JDD. (2012). Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol.***50**: 294–299.
225. Banerjee R., Johnston B., Lohse C., Chattopadhyay S., Tchesnokova V., Sokurenko E V., *et al.* (2013). The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**:5912–5917.
226. Nicolas-Chanoine M-H., Bertrand X., Madec J-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* **27**: 543–74.
227. Nicolas-Chanoine MH., Blanco J., Leflon-Guibout V., Demarty R., Alonso MP., Caniça MM., *et al.* (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **61**:273–281.
228. Peirano G., Van Der Bij AK., Freeman JL., Poirel L., Nordmann P., Costello M., *et al.* (2014). Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**: 3762–3767.
229. Wang L., Wakushima M., Aota T., Yoshida Y., Kita T., Maehara T., *et al.* (2013). Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl Environ Microbiol.* **79**(4):1232–1240.
230. Badouei MA., Jajarmi M., Mirsalehian A. (2015). Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **38**:15–20.

231. Martins FH., Guth BEC., Piazza RM., Leao SC., Ludovico A., Ludovico MS., *et al.* 2015. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, Southern Brazil. *Vet Microbiol.* **175(1)**:150–156.
232. Johnson JR., Johnston B., Clabots C., Kuskowski MA., Castanheira M. (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* **51**: 286–294.

# **Annexes**

## Coloration de GRAM

Afin de confirmer le GRAM (-) des souches, nous avons réalisé la coloration de Gram qui se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen.
- recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laissé agir une minute (violet de gentiane).
- rejeter le colorant puis laver à l'eau.
- recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute.
- rejeter le Lugol puis laver à l'eau.
- décolorer à l'alcool 95°.
- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes.
- rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propre.

**Lecture :** des bactéries Gram négatif, roses, coccobacille.

**Séquences :**

>17seq109 CMY-16 (COL20170005)

TGATTTTCATGATGAAAAATCGTTATGCTGCGCTCTGCTGCTGACAGCCTCTTTCTCCACATTTGCTGCCGCAA  
AACAGAACAACAGATTGCCGATATCGTTAATCGCACCATCACCCCGTTGATGCAGGAGCAGGCTATCCGGGT  
ATGGCCGTTGCCGTTATCTACCAGGGAAAACCTATTATTTACCTGGGGTAAAGCCGATATCGCCAATAACCA  
CCCAGTCACGCAGCAAACGCTGTTTGGAGCTAGGATCGGTTAGTAAGACGTTTAAACGGCGTGTGGGGCGGCGAT  
GCTATCGCCCGCGGCGAAATTAAGCTCAGCGATCCGGTCACGAAATACTGGCCAGAAGTACAGGCAAACAG  
TGCCAGGGTATCCGCCTGCTGCACTTAGCCACCTATACGGCAGGCGGCCTACCGCTGCAGATCCCCGATGACG  
TTAGGGATAAAGCCGCACTACTGCATTTTTATCAAACTGGCAGCCGCAATGGACTCCGGGCGCTAAGCGACT  
TACTCTAACTCCAGCATTGGTCTGTTTGGCGCGCTGGCGGTGAAACCTCAGGAATGAGTTACGAAGAGGCA  
ATGACCAGACGCGTCTGCAACCATTAAACTGGCGCATACCTGGATTACGGTCCGCAGAACGAACAAAAG  
ATTATGCCAGGGGCTATCGCGAAGGGAAGCCCGTACACGTTTCTCCGGGACAACCTGACGCCGAAGCCTATGG  
CGTGAAATCCAGCGTTATTGATATGGCCCGCTGGGTTACAGCCAACATGGATGCCAGCCACGTTACAGGAGAAA  
ACGCTCCAGCAGGGCATTGCGCTTGCAGCTCTCGCTACTGGCGTATTGGCGATATGTACCAGGGATTAGGCT  
GGGAGATGCTGAACTGGCCGCTGAAAGCTGATTGATCATCAACGGCAGCGACAGCAAAGTGGCATTGGCAG  
CGTTCCCGCCGTTGAGGTAAACCCGCCCGCCCCGAGTGAAAGCCTCATGGGTGCATAAAACGGGCTCCAC  
TGGTGGATTTGGCAGCTACGTAGCCTTCGTTCCAGAAAAAACCTTGGCATCGTGATGCTGGCAAACAAAAGC  
TATCCTAACCTGTCCGTGTCGAGGCGGCCTGGCGCATTCTTGAAAAGCTGCAATAACTGGAAAA

>17seq110 CMY-16 (COL20170006)

ATGAAGTTGTTGGAAAACCTTCCGTACAAGGGAGTGTGGAAAAAGTTTGGTTTTATTAGAAATTTATCAATA  
AAATTGAGTGTGCTCTGTGGATAACTGCAGAGTTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATT  
TATCAAAAATGATTGAAAGGTGGTTGTAAATAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTTTTCGTGAAAT  
AGTGATTTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGAAAACTTATATCTGCTGCTAAATTTAACCGT  
TTGTCAACACGGTGCAAATCAAACACACTGATTGCGTCTGACGGGCCCCGACACCTTTTTGCTTTTAATTACGG  
AACTGATTTTCATGATGAAAAATCGTTATGCTGCGCTCTGCTGCTGACAGCCTCTTTCTCCACATTTGCTGCCGC  
AAAAACAGAACAACAGATTGCCGATATCGTTAATCGCACCATCACCCCGTTGATGCAGGAGCAGGCTATTCCG  
GGTATGGCCGTTGCCGTTATCTACCAGGGAAAACCTATTATTTACCTGGGGTAAAGCCGATATCGCCAATAA  
CCACCCAGTCACGCAGCAAACGCTGTTTGGAGCTAGGATCGGTTAGTAAGACGTTTAAACGGCGTGTGGGGCGG  
GATGCTATCGCCCGCGGCGAAATTAAGCTCAGCGATCCGGTCACGAAATACTGGCCAGAAGTACAGGCAA  
CAGTGGCAGGGTATCCGCCTGCTGCACTTAGCCACCTATACGGCAGGCGGCCTACCGCTGCAGATCCCCGATG  
ACGTTAGGGATAAAGCCGCACTACTGCATTTTTATCAAACTGGCAGCCGCAATGGACTCCGGGCGCTAAGCG  
ACTTTACTCTAACTCCAGCATTGGTCTGTTTGGCGCGCTGGCGGTGAAACCTCAGGAATGAGTTACGAAGAG  
GCAATGACCAGACGCGTCTGCAACCATTAAACTGGCGCATACCTGGATTACGTTCCGCAGAACGAACAAA  
AAGATTATGCCAGGGGCTATCGCGAAGGGAAGCCCGTACACGTTTCTCCGGGACAACCTGACGCCGAAGCCT  
ATGGCGTGAAATCCAGCGTTATTGATATGGCCCGCTGGGTTACAGCCAACATGGATGCCAGCCACGTTACAGGA  
GAAAACGCTCCAGCAGGGCATTGCGCTTGCAGCTCTCGCTACTGGCGTATTGGCGATATGTACCAGGGATTA  
GGCTGGGAGATGCTGAACTGGCCGCTGAAAGCTGATTGATCATCAACGGCAGCGACAGCAAAGTGGCATTG  
GCAGCGCTTCCCGCCGTTGAGGTAAACCCGCCCGCCCCGAGTGAAAGCCTCATGGGTGCATAAAACGGGCT  
CCACTGGTGGATTTGGCAGCTACGTAGCCTTCGTTCCAGAAAAAACCTTGGCATCGTGATGCTGGCAAACAA  
AAGCTATCCTAACCTGTCCGTGTCGAGGCGGCCTGGCGCATTCTTGAAAAGCTGCAATAACTGGAAAA



---

>17seq108 SHV-2 (COL20170041)

ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCC  
GCTTGAGCAAATTAATAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAG  
CGGCCGCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGC  
GGCGCAGTGCTGGCGGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGA  
TCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCC  
GCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTG  
CCTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCC  
CGGCGACGCCCGGACACCACTACCCCGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCG  
TCTGAGCGCCCGTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCG  
CTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTAGCGAGCGGGGTGCGCGCGGGATTGT  
CGCCCTGCTTGCCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGGCGAGCATG  
GCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAAA

## Production scientifique

### Article :

**Meziani M.**, Benlabed K., Bogaerts P., Glupczynski Y. (2020). The first report of the coproduction of CMY-16 and ArmA 16S rRNA methylases in carbapenemase -ESBL producing *Escherichia coli* isolates. *European Journal of Biological Research*. **10 (2)**: 96-104.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3776651>

# The first report of the coproduction of CMY-16 and ArmA 16S rRNA methylases in carbapenemase-ESBL producing *Escherichia coli* isolates

Meriem Meziani<sup>1\*</sup>, Kaddour Benlabed<sup>2</sup>, Pierre Bogaerts<sup>3</sup>, Youri Glupczynski<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mentouri Brothers, Constantine1, Algeria

<sup>2</sup> Laboratory of Bacteriology, CHU of Constantine, Algeria

<sup>3</sup> National Belgian Reference Center for Antimicrobial Resistance in Gram-negative Bacteria and Microbiology Laboratory of the University Hospital CHU Mont-Godinne, Catholic University of Louvain (UCL), Av Dr. Gaston Therasse1, 5530 Yvoir, Namur, Belgium

\*Correspondence: Phone: +213778730802; E- mail: Meziani\_meri25@yahoo.fr

Received: 18 March 2020; Revised submission: 20 April 2020; Accepted: 27 April 2020



<http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/ejbr>

Copyright: © The Author(s) 2020. Licensee Joanna Bródka, Poland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

**ABSTRACT:** The main aim of this work was to assess the occurrence and to characterize AmpC genes and to investigate the co-existence of 16S rRNA methylases and carbapenemases genes among the ESBL producing *Escherichia coli* strains. 180 *Escherichia coli* clinical strains were collected from the university hospital of Constantine located in the eastern part of Algeria. 42 ESBL-producers were phenotypically identified and also confirmed genotypically able to produce *CTX-M-15* [n=33], *CTX-M-1* [n=5], *CTX-M-14* [n=1], *SHV-2* [n=1], and two strains have been revealed producing the *bla*<sub>OXA-48</sub> genes associated with *bla*<sub>TEM-1</sub>. Among the ESBL-producing strains three expressed additionally an AmpC phenotype which corresponded to the carriage of a *bla*<sub>CMY</sub> gene shown by sequencing to correspond to *CMY-2* (1 isolate) *CMY-16* (2 isolates). The two *E. coli* isolates produce *CMY-16* that belonged to phylogroup D while the single *CMY-2* producing isolate belonged to phylogroup C. Antibiotic resistance of the aminoglycoside family by production of 16S rRNA methylases was detected by an end-point multiplex PCR assay which concerns genes coding for different 16S rRNA methylases (*rmtD*, *rmtA*, *rmtB*, *armA*, *npmA*, and *rmtC*). An *armA* gene was identified in 2 strains. This study shows for the first time the co-existence of *CMY-16* and *armA* genes with *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> producing *E. coli* strains.

**Keywords:** AmpC  $\beta$ -lactamase *CMY-16*; *Escherichia coli*; ArmA 16S rRNA methylases; ESBL coproduction.

## 1. INTRODUCTION

The worldwide spread of genes conferring resistance to different antibiotics is considered as a major cause of mortality in hospitals [1]. *Escherichia coli* strains have been characterized by their resistance to antibiotics used in therapy [2]. The emergence of resistant strains to different families of antibiotics such as  $\beta$ -lactams, and aminoglycosides pose a serious therapeutic problem in hospitals [3, 4]. In addition to the spread of  $\beta$ -lactam resistance, *E. coli* sequence type (ST131) has disseminated internationally and the strains

are considered to be truly pathogenic due to the spectrum of infectious they cause in both communities and hospitals [5].

The resistance of *E. coli* strains to  $\beta$ -lactam antibiotics is rapidly disseminated and it is mainly related to the production of  $\beta$ -lactamases [6]. The production of AmpC is considered to be one of the mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam in the *Enterobacteriaceae* family, conferring resistance to all  $\beta$ -lactam antibiotics except fourth-generation cephalosporins and carbapenems [7]. The genes that code for these enzymes are of chromosome or plasmid origin [8]. The AmpC-lactamases were identified among *Enterobacteriaceae*, particularly in *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* and also in naturally AmpC-producing species [9, 10]. The dissemination of resistance to aminoglycosides was also identified [11]. Aminoglycoside resistance by the production of 16S rRNA methylases is the most recognized type of resistance to these antibiotics [3, 12]. The first discovery of the *armA* gene occurred in 2003. Then, after the different studies, eight plasmid-mediated 16S rRNA methylases (*rmtC*, *rmtA*, *armA*, *rmtE*, *rmtB*, *rmtD*, *npmA*, and *rmtF*) were detected in clinical strains of gram negative bacilli [13, 14]. Currently, eleven 16S rRNA methylases genes (*armA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtC*, *rmtF*, *rmtA*, *npmA*, *rmtD2*, *rmtG* and *rmtH*) have been identified, of which *ArmA* and *RmtB* were the most frequently found methylase in strains of *Enterobacteriaceae* [15, 16]. 16S rRNA methyltransferase enzymes are generally seen together with carbapenemases and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL). Coproduction of  $\beta$ -lactamase and 16S rRNA methylases among strains of *Enterobacteriaceae* leads to resistance to all treatment modalities [11, 16].

In this work we aimed to characterize the AmpC  $\beta$ -lactamase and 16S rRNA methylases among the ESBL and carbapenemases producing *Escherichia coli*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Collection of strains

180 *E. coli* strains were collected from patients hospitalized at the university hospital of Constantine Abdelhamid Ben Badis, Algeria. These samples were collected from different pathological humans' specimens including wounds, pus, urine, blood and other body fluids such as gastric fluid and ascites fluid. These strains were characterized by standard bacteriological technique and the classic biochemical gallery and confirmed at the species level by the technique of MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) by using Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany) based on the MALDI BioTyper database (version IVD 2.2 DB-5989 MSP).

### 2.2. In vitro antimicrobial sensitivity and phenotypic identification of resistance mechanisms

Antibiotic sensitivity testing was performed by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar and Microscan according to CLSI 2012 guidelines, for the following antibiotics: beta-lactam family (aztreonam, amoxicillin/clavulanate, ampicillin, cefotaxime, cefuroxime, ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, temocillin, ceftoxitin, ertapenem, meropenem), sulfonamides family (cotrimoxazole), quinolone family (ciprofloxacin), aminoglycoside family (amikacin and gentamicin).

All ceftoxitin-resistant isolates (diameter of the inhibition zone <18 mm according to CLSI 2012) from this collection were selected for screening for AmpC genes. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production has been detected by studying the resistance of the strains to third-generation cephalosporins and also by the double-disk synergy test.

Strains with reduced sensitivity to meropenem or ertapenem were identified phenotypically for the production of carbapenemase enzymes by Carba NP assay as previously reported by Nordmann et al. [17], the

modified Hodge test and the inhibition of the metallo- $\beta$ -lactamase activity by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as previously described by Bakour et al., and Yong et al. [18, 19]. Aminoglycosides resistance induces the research of 16S rRNA methylases production in the isolates by detecting the genes involved in their biosynthesis.

### 2.3. Extraction of DNA from bacterial strains

By the boiling lysis method, the DNA has been obtained. Suspensions of the analyzed strain and the control were prepared in 200  $\mu$ L of sterile distilled water, boiled at (100°C for 10 min and centrifuged at 13'000  $\times$  g for 10 min). The supernatants were used as DNA template for PCR amplification assays [20].

### 2.4. Genotypic identification of ESBL, AmpC, 16S rRNA methylase and carbapenemase genes

Screening for genes encoding conventional ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>), AmpC genes (*CMY*, *FOX*, *ACC*, *MIR*, *ACT*, *MOX*, *DHA*), carbapenemase genes (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) and the 16S rRNA methylases genes (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, and *npmA*) was performed by an end-point multiplex PCR assay as previously described by Perez-Perez et al. and Bogaerts et al. [8, 20], followed by sequencing the PCR products such as (*CTX-M*, *SHV*, *TEM*, *CMY*). The products of the sequencing were compared to the sequences reported in Gen-Bank [21].

### 2.5. Sequence type ST131 determination

Identification of the ST131 clone was carried out using O25b-ST131 clone allele-specific PCR for the *papB* gene [22].

### 2.6. Phylogenetic groups

The determination of phylogenetic groups of *E. coli* strains was performed by PCR method for phylo-group assignment according to revised Clermont method. Each strain was assigned to one of eight major phylo-groups that are as follows (A, B1, B2, C, D, E, F, and clade I) [23].

## 3. RESULTS

### 3.1. Bacterial strains and ESBL producers

The double-disk synergy test for phenotypic detection of ESBL production revealed that 42 samples of *E. coli* (23%) produced ESBLs. The strains were mainly recovered from urine samples (60%), pus samples (30%) and those of other body fluids (10%).

Antibiotic resistance profile and sensitivity showed that all ESBL strains expressed resistance to multiple antimicrobial agents. The strains are highly resistant to ampicillin, cefuroxime, cefotaxime, cefepime and aztreonam. The strains resistance to other antibiotics was high for gentamicin (63%) ciprofloxacin (61%) and cotrimoxazole (60%) but low for amikacin (5%). The isolates showed a high sensitivity to piperacillin-tazobactam (95%), ertapenem and meropenem with a frequency of (95%), temocillin (92%), ceftazidime (85%), amoxicillin-clavulanate (83%), and ceftazidime (66%) (Table 1).

According to CLSI 2012 recommendations, two isolates were obtained from two different patients urine samples were resistant to ertapenem (diameter of the inhibition zone  $\leq$  18 mm) and to the majority of antibiotics used. However, these two strains exhibited intermediate resistance to meropenem and they were sensitivity to ciprofloxacin and cefepime.

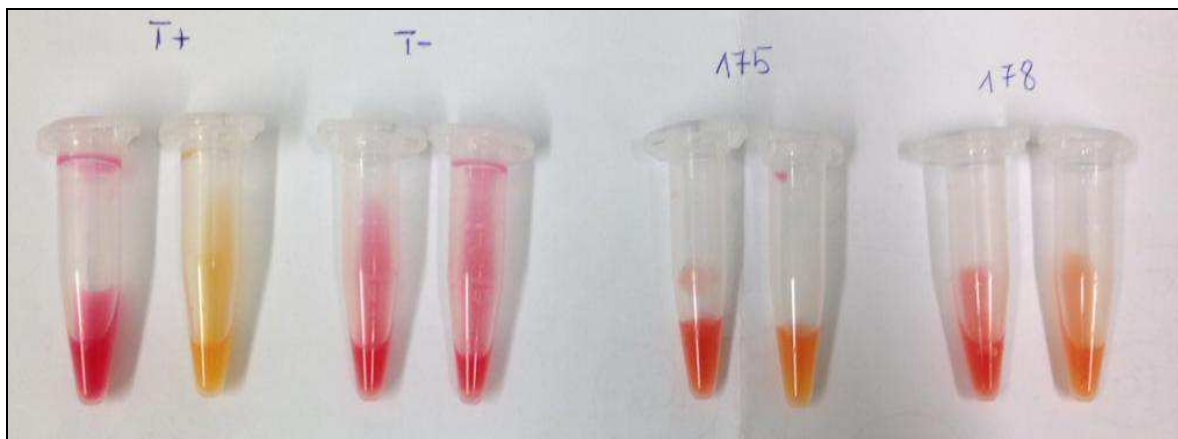
**Table 1.** The antibiotic resistance and sensitivity profile of the ESBL strains of *E. coli*.

Antibiotics	ESBL strains of <i>E. coli</i>	
	Phenotype	Percentage %
Ampicillin	Resistant (R)	100
Cefuroxime		99
Cefotaxime		99
Cefepime		70
Aztreonam		65
Gentamicin		63
Ciprofloxacin		61
Cotrimoxazole		60
Amikacin		5
Piperacillin-Tazobactam		Sensitive (S)
Ertapenem	95	
Meropenem	95	
Temocillin	92	
Cefoxitin	85	
Amoxicillin-clavulanate	83	
Ceftazidime	66	

### 3.2. Detection of carbapenemase production

#### 3.2.1. Carba NP test

Carba NP is a rapid test for screening carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae*. In our study this assay is based on the ertapenem's hydrolysis with a color change of a phenol indicator from red to orange or yellow (positive result) [17]. Only two strains of *E. coli* (*E. coli* 175, *E. coli* 178) were found to be producing carbapenemases (Figure 1).



**Figure 1.** Carba NP test positive with two strains of *E. coli* OXA type; hydrolysis of ertapenem with a color change of a phenol indicator from red to orange or Yellow. From left to right the second tube is the one that is inoculated for (T+, T-, 175, 178).

T+: positive control NDM positive *E. coli*; T-: negative control *E. coli* J53

178: *E. coli* 1 (Ec1) carbapenemase positive; 175: *E. coli* 2 (Ec2) carbapenemase positive

### 3.2.2. Modified Hodge test

The presence of a carbapenemase is exposed by the deformation of the zone of inhibition due to the enzymatic activity around the antibiotic close to the suspect strain (Figure 2). By contrast, the EDTA test was observed negatively because the carbapenemases produced by these two strains of *E. coli* were not linked to NDM, VIM or IMP genes expression.



**Figure 2.** Modified Hodge test positive with two strains of *E. coli* (Ec 175 and Ec 178); inactivation of carbapenem by carbapenemase-producing strains that enables a carbapenem-susceptible indicator strain to extend growth towards a carbapenem-containing disc, along the streak of inoculum of the tested suspected carbapenemase.

### 3.3. Genotypic analysis of antibiotic resistance genes

The results of the end-point multiplex PCR and sequencing showed the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> in 39 strains (5 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, 1 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, 33 *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) while *bla*<sub>SHV-2</sub> was detected in one isolate and *bla*<sub>TEM-1</sub> in two isolates. In addition the detection of AmpC gene like *CMY-2* was showed in one strain of *E. coli* among the CTX-M-15 producing strains and the presence of *CMY-16* in two strains of *E. coli* (TEM-1). These two strains have also been revealed to be producing carbapenemases (OXA-48) and 16S rRNA methylases (ArmA).

### 3.4. Sequence type ST131 and phylogenetic groups determination

Detection of the ST131 clone using PCR targeting the *papB* gene revealed that 16 isolates (CTX-M-15) were ST131 positive and that they belonged to phylogroup B2. While the other strains were ST131 negative, among them two isolates (CTXM-15) belonged to group B2, two (CTXM-15) to group A, five (CTXM-1) to group B1, eight (CTXM-15) to group D, three (CTXM-15) to group C, two (CTXM-15) to group F, one (CTXM-14) to group D, one (SHV2) to group B1 and two (TEM-1) belonged to group D (Table 2).

**Table 2.** Phylogenetic groups and sequence type ST131 of the ESBLs producing strains.

Phylogenetic groups	B2		A		B1		D		C	F	D
ESBL type	CTX-M-15	CTX-M-15	CTX-M-15	CTX-M-1	SHV-2	CTX-M-15	CTX-M-14	CTX-M-15	CTX-M-15	TEM-1	
ST131	Pos (+)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)	
Number	16	2	2	5	1	8	1	3	2	2	

#### 4. DISCUSSION

In our study, *E. coli* produced CTX-M15 that is the most common ESBL type, which confirms previous studies [24]. A similar situation is also observed in another country in North Africa in Morocco [25] which confirms the high dissemination of CTX-M15 producing *E. coli* isolates. Comparing to other studies [26], our study confirms the dissemination of *E. coli* ST131 associated with the CTX-M-15 Extended-Spectrum beta-lactamase and attests the serious worldwide problem of multidrug-resistant pathogen *E. coli* strains.

CTX-M1, CTX-M14, TEM-1, SHV-2 and OXA-48 genes were detected in *E. coli* strains identified in this study have been also mentioned in previous findings [25, 27]. Nevertheless, the SHV-2 ESBL that was identified in this study was never described to date among *E. coli* clinical isolates in Algeria, but one study revealed the detection of SHV-12 ESBL in clinical strains of *E. coli* isolated from hospitals in the west of Algeria [27].

The *armA* gene which was detected in our analyzed strains was identified previously in 2016. A report from the west of Algeria [27] had revealed that there were four ArmA producers among *E. coli* strains which were gathered from some hospitals in the western part of Algeria.

Concerning the AmpC  $\beta$ -lactamase production in this study, the sequence analysis, showed that *bla*<sub>CMY</sub> genes detected were *bla*<sub>CMY-2</sub> (one isolate) and *bla*<sub>CMY-16</sub> (two isolates). The CMY-2 type is the most frequent, especially in Europe (France, Spain, Italy, and Turkey [28, 29], in Canada, Argentina, Tunisia and Algeria [27, 30, 31]. So, our results are consistent with the previous results.

CMY-16, a variant of the CMY lineage was first detected in *Proteus mirabilis* that was isolated from Italy [32] and since then it has been detected throughout the world. CMY-16 was found to be the most prevalent variant of AmpC  $\beta$ -lactamases in Europe [33]. A study in Italy demonstrated the co-existence of CMY-16 in association with TEM-92 which is an ESBL in *Proteus mirabilis* isolates [34]. Similarly as in another study in Croatia, CMY-16 was found in *Proteus mirabilis* in association with TEM-1 [35]. In Switzerland CMY-16 was detected in association with OXA-48, CTXM-15 and ArmA [36] in *Klebsiella pneumoniae* strains. As well as, In Tunisia they have reported the coproduction of CMY-16 and OXA-1 in *E. coli* strains [37].

Here, in our study we report the first detection of CMY-16 gene in association with TEM-1 BLSE, OXA-48 carbapenemase and ArmA 16S rRNA methylases in *E. coli* strains. The combination reported in this study was not described before: two strains of *E. coli* CMY-16 co-produced TEM-1 plus OXA-48 and ArmA. The phylogenetic study showed that these two strains belonged to phylogenetic group D and they were ST131 negative. In fact they were collected from two different patients.

So, the dissemination of CMY-16 and *armA* genes detected in carbapenemase-ESBL producing *E. coli* clinical samples is a major problem. The emergence of this resistant type should be controlled and limited through molecular surveillance.

#### 5. CONCLUSION

According to data published, we describe here the first detection of multiresistant isolates of *E. coli* that co-produced: CMY-16, TEM-1, OXA-48 and ArmA. Our study confirms the major problem of multi-resistance of *E. coli* strains. The association of multiple resistance genes in *E. coli* strains is a disturbing situation. So, there is a need to detect and to control their dissemination by creating new treatments to contain the risk of spread.



**Authors' Contributions:** MM: Collection of samples, designed the study and protocol, Conception of the paper and design of the manuscript; acquisition of data, Analysis and interpretation of data, managed literature search, writing and revision of the manuscript. KB: provided the strains, administrative support. PB and YG: technical support, development of methodology, review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Funding:** University of Mentouri Brothers, Constantine1, Algeria is acknowledged for funding this work.

## REFERENCES

1. Arunagiri K, Sekar B, Sangeetha G, John J. Detection and characterization of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and molecular methods from clinical samples in a tertiary care hospital. *West Indian Med J.* 2012; 61: 778-783.
2. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(1): 54-61.
3. Krishnappa LG, John J, Marie MAM, Gopalkrishnan S, Pradeep CS, Rani SRB. Detection of pan-amino glycoside-resistant Gram negative bacteria using a molecular method. *South Asian J Exp Biol.* 2012; 2: 256-8.
4. Sahni RD, Balaji V, Varghese R, John J, Tansarli GS, Falagas ME. Evaluation of fosfomycin activity against uropathogens in a fosfomycin-naïve population in South India: a prospective study. *Future Microbiol.* 2013; 8: 675-680.
5. Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, et al. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalized at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 1641-1646.
6. Mammina C, Di Carlo P, Cipolla D, Giuffrè M, Casuccio A, Di Gaetano V, et al. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am J Infect Control.* 2007; 35: 222-230.
7. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-mediated AmpC-type-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1-11.
8. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC betalactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2153-2162
9. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G. Prevalence of plasmid-mediated AmpC-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34: 340-342.
10. Yim G, Kwong W, Davies J, Miao V. Complex integrons containing qnrB4-ampC (blaDHA-1) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. *Can J Microbiol.* 2013; 59: 110-116.
11. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 305-312.
12. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J-I, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 491-496.

13. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2565-2571.
14. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant *RmtF* with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 1543-1550.
15. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 642-646.
16. Bogaerts P, Galimand M, C Bauraing, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 459-464.
17. Nordmann P, Poirel L, Dartet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1503-1507.
18. Bakour S, Olaitan AO, Ammari H, Touati A, Saoudi S, Saoudi K, Rolain JM. Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microb. Drug Resist.* 2015; 21(3): 279-285.
19. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10): 3798-3801.
20. Bogaerts P, Rezende de Castro R, De Mendonça R, Huang TD, Denis O, Glupczynski Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum beta-lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 1576-1582.
21. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clones O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(2): 273-281.
22. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15 producing strains. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 274-277.
23. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol.* 2013; 5: 58-65.
24. Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Decré D, Genel N, Boucherit-Otmani Z, Arlet G, Drissi M. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb Drug Resist.* 2013; 19: 185-190.
25. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 350-354.
26. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(1): 1-14.
27. Ayad A, Drissi M, de Curraize C, Dupont C, Hartmann A, Solanas S, et al. Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1409.

28. Verdet C, Benzarara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlet G. Emergence of DHA-1 producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 607-617.
29. Yilmaz NO, Agus N, Bozcal E, Oner O, Uzel A. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J Med Microbiol.* 2013; 31: 53-59.
30. Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PR, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Tailor F, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase, AmpC beta-lactamase and carbapenemase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 57-65.
31. Mnif B, Ktari S, Chaari A, Medhioub F, Rhimi F, Bouaziz M, Hammami A. Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates carrying blaOXA-48, blaPER-1, blaCMY-4 and qnrA6 in a Tunisian hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 329-332.
32. D'Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacca R, Vailati F, et al. CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 618-624.
33. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, et al. Evolution and spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 2735-2742.
34. Migliavacca R, Migliavacca A, Nucleo E, Ciaponi A, Spalla M, De Luca C, Pagani L. Molecular epidemiology of ESBL producing *Proteus mirabilis* isolates from a long-term care and rehabilitation facility in Italy. *New Microbiol.* 2007; 30: 362-366.
35. Bedenić B, Firis N, Elvedi-Gašparović V, Krilanović M, Matanović K, Štimac I, et al. Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a longterm care facility in Croatia. *Wiener Klin Wochenschrift.* 2016; 128: 404-413.
36. Salome NS, Jonas M, Vincent P, Alessandra C, Hansjakob F, Andrea E. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 44: 260-262.
37. Chérif T, Saidani M, Decré D, Boutiba-Ben Boubaker I, Arlet G. Cooccurrence of multiple AmpC-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 44-51.

<b>Année universitaire : 2020/2021</b>	<b>Présentée par : MEZIANI Meriem</b>
<b>Intitulé : Analyse moléculaire et étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'<i>Escherichia coli</i> productrices de B-lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées au CHU de Constantine</b>	
<b>Thèse de Doctorat</b>	
<p><b>Résumé :</b></p> <p>L'espèce <i>Escherichia coli</i> est parmi les bactéries responsables des infections nosocomiales et des épidémies. La résistance d'<i>E. coli</i> aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante du fait de la production de <math>\beta</math>-lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces microorganismes, responsables d'infections nosocomiales se retrouvent résistants à plusieurs familles d'antibiotiques comme les B-lactamines et les aminosides. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Le but de cette étude était d'étudier la résistance aux antibiotiques des souches d'<i>E. coli</i> isolées au CHU de Constantine entre 2013-2015, et la caractérisation des gènes <i>AmpC</i> ainsi que l'étude de la coexistence des gènes de l'ARNr 16S méthylases et des carbapénémases dans des Souches d'<i>Escherichia coli</i> productrices des BLSE.</p> <p>235 souches d'<i>E. coli</i> ont été collectées et l'identification a été effectuée en utilisant les galeries biochimiques classiques et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, l'étude de sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion de disques sur gélose) a été réalisée selon les recommandations de CLSI. Une recherche phénotypique de la production de <math>\beta</math>-lactamases à spectre étendu (BLSE), et de carbapénémases a été également effectuée. Par ailleurs, les gènes de résistance aux antibiotiques ont été caractérisés par les techniques de Biologie Moléculaire (PCR et séquençage). Ensuite, la détermination du clone ST131 et les groupes phylogénétiques des souches d'<i>E. coli</i> BLSE a été réalisée en utilisant respectivement la PCR spécifique ciblant le gène <i>papB</i> selon la méthode de Clermont <i>et al.</i>, 2009 pour la détection du clone ST131 et la PCR des phylogroupes selon la méthode révisée de Clermont <i>et al.</i>, 2013.</p> <p>Dans cette étude on rapporte pour la première fois la description des souches d'<i>E. coli</i> co-exprimant à la fois les gènes <i>ArmA</i>, <i>OXA-48</i>, <i>CMY-16</i> et <i>TEM-1</i>. Ces souches isolées au CHU de Constantine étaient résistantes aux <math>\beta</math>-lactamines et aux aminosides par production de BLSE, des céphalosporinases, des carbapénémases et des méthylases de l'ARNr 16S. Soulignant ainsi l'augmentation de la fréquence des souches d'<i>E. coli</i> multirésistantes, ce qui nécessite d'établir des mesures de contrôle dans les hôpitaux algériens pour éviter leur diffusion.</p>	
<p><b>Mot clés :</b> <i>E. coli</i>, résistance aux antibiotiques, BLSE, 16S ARNr méthylases (<i>armA</i>), <i>CMY-16</i>, <i>OXA-48</i>, CHU de Constantine.</p>	
<p><b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de Biochimie Appliquée</p> <p><b>Membres du jury :</b></p> <p><b>Présidente :</b> SATTI Dalila (Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1)</p> <p><b>Directeur de thèse :</b> BENLABED Kaddour (Professeur, Université Constantine 3).</p> <p><b>Examineurs :</b></p> <p style="padding-left: 40px;">Sekhri-Arafa Nedjoua (Maitre de conférences A, Université Frères Mentouri Constantine 1)</p> <p style="padding-left: 40px;">Benmhidhi Messaoud (Maitre de conférences A, Faculté de Médecine, Université de Batna)</p> <p style="padding-left: 40px;">Laouar Hocine (Professeur, Université Constantine 3).</p>	

