

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM**  
جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers**  
**Département de Biologie**



## **MÉMOIRE**

Présenté par **Matoug Manel et Khalid Soumia**

En vue de l'obtention du : **Diplôme de MASTER**

**En : Microbiologie Fondamentale**

## **Thème**

*Etat actuel de la résistance aux antibiotiques  
chez les entérobactéries en milieu hospitalier dans  
l'Oeust algérien*

**Le jury composé de :**

**Président : Mr REBIAHI S**

**Examineur : Mme MESLI A**

**Encadrant : Mme AYAD A**

**Année universitaire 2020/2021**

# *Remerciements*

On tient tout d'abord à remercier vivement le bon dieu, de nous avoir donné la force pour réaliser ce modeste travail.

On présente nos remerciements à notre encadreur madame **Ayad Amel** Maître de conférences au département de Biologie à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail. Sa patience, sa disponibilité, sa gentillesse inestimable, ses qualités humaines, sa confiance, et la qualité de son encadrement scientifique et aussi ses compétences et ses conseils précieux qui nous ont guidé et orienté tout au long de ce mémoire.

Nos sincères remerciements à Mr **Rebiahi Sid Ahmed**, Professeur au département de Biologie à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur en acceptant de présider le jury.

Nous voudrions remercier aussi Madame **Mesli Asma**, Maître de conférences au département de Biologie à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de nous avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation le long de ces années

# *Dédicaces*

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu achever cet humble travail.

Que je dédie :

**A mes chers parents Ali et Souad** pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien, Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer vers l'avant. Qu'Allah vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

**A mon cher frère « Mohammed » Anis et mes belles sœurs Meriem et Douha** pour tous vos conseils, votre amour et votre soutien moral.

**A ma chère grand-mère Yamina**

**La mémoire de ma grande mère Halima, mes grand pères Abed Allah et Belhier que Dieu les accueille dans son vaste paradis**

*Manel*

## **A Mon trésor Ma très chère Mère**

J'ai toujours attendu avec une grande impatience ce jour ou de manière solennelle et devant l'ensemble de mes maitres, ma famille et mes amis, Je vous témoignerai toute la gratitude d'une fille qui s'est toujours vantée de vous avoir comme mère.

Aucune dédicace, aucun mot n'est susceptible de vous exprimer la profondeur de mon amour, de mon respect, de mon estime et l'infinie reconnaissance pour tous les sacrifices consentis avec dévouements pour mon éducation et mes longues années d'études. Vous avez guetté mes pas et vous m'avez couvé de tendresse, vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je serai votre dévoué pour tout le restant de mon existence et nulle déclaration ne m'allégerais de la lourde responsabilité dont je me sens investie à votre égard. Ce travail, et ce que je suis aujourd'hui sont le fruit de toutes les peines et tous les sacrifices que vous n'avez cessé de déployer. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ces enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Maman tu étais ma lumière, tout simplement merci pour votre esprit attentif, pour l'amour, l'écoute et le soutien que je trouve toujours auprès de vous. Vous êtes et vous serez toujours pour moi le plus beau don de toute ma vie Je n'arriverai jamais à vous remercier autant que vous le méritiez pour m'avoir donné la vie, ton amour inconditionnel et sans défaut, ta générosité, tes sacrifices, tes conseils, tes prières, ta bienveillance, ta patience et tes encouragements tout au long de ma vie... Vous avez toujours été là et m'avez soutenue dans tous mes choix.

J'aimerais que tu sois avec nous maintenant, Je sais que t'aurais été plus fier de moi à ce jour, si j'arrive à cette réussite c'est grâce à toi, c'est ta réussite maman pas la mienne.

Tu es toujours présent dans mon cœur je ne t'oublierai jamais. Même si tu n'es plus là tu resteras toujours l'exemple de la meilleure femme que j'ai connue toute ma vie. Que dieu t'accueil dans son vaste paradis. **Je t'aime maman.**

*Soumia*

## Résumé :

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif responsables d'infections humaines graves. La surveillance de la sensibilité aux antibiotiques à l'hôpital est une étape essentielle ; elle oriente le choix des traitements empiriques et permet de réduire la pression de sélection exercée par les antibiotiques. Dans cette étude 7 articles ont été analysés. Ces articles reportent des données phénotypiques et moléculaires sur des souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques, isolées de trois grands CHU de l'ouest algérien (CHU de Sidi Bel Abbès, CHU de Tlemcen et CHU d'Oran). L'étude de la sensibilité aux différents antibiotiques, dont les  $\beta$ -lactamines, aminosides, quinolones, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la colistine par différentes méthodes, a révélé des taux de résistance élevés pour la plupart des antibiotiques testés. Différents gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été détectés avec dominance du gène codant la  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) *CTX-M* (*CTX-M-15* et *CTX-M-3*), et émergence de nouveaux gènes ; (*blaSHV-12*), *blaTEM* (*blaTEM-167*), *blaCMY* (*blaCMY-16*, *blaCMY-2*), d'autres gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB* pour la première fois en Algérie, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aadA* et *aadB*), aux quinolones (*qepA1*, *qepA3* et *oqxAB* pour la première fois en Algérie, *aac(6')-Ib-cr*, *qnr(A, B, S, C, D)* au triméthoprim/Sulfaméthoxazole (*dfp* et *sul*) et à la colistine (*mcr-1* pour la première fois en Algérie) ont été également détectés. Ces résultats montrent que la fréquence de ces bactéries multirésistantes augmente de façon inquiétante dans nos établissements de soin et leur émergence représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la nécessité de la mise en place d'un système de surveillance de l'environnement microbien de l'hôpital et l'application stricte des mesures d'hygiène.

**Mots-clés :** Entérobactéries, antibiotiques, résistance aux antibiotiques, Ouest algérien.

## **Abstract**

Enterobacteriaceae are one of the main families of Gram-negative bacilli responsible for serious human infections. Monitoring antibiotic sensitivity in the hospital is an essential step; it guides the choice of empirical treatments and makes it possible to reduce the selection pressure exerted by antibiotics. In this study 7 articles were analyzed. These articles report phenotypic and molecular data on enterobacteriaceae strains multiresistant to antibiotics, isolated from three large university hospitals in western Algeria (Sidi Bel Abbas university hospital, Tlemcen university hospital and Oran university hospital. The study of sensitivity) to different antibiotics, including  $\beta$ - lactams, aminoglycosides, quinolones, trimethoprim / sulfamethoxazole and colistin by different methods, revealed high resistance rates for most of the antibiotics tested. Different genes for resistance to  $\beta$ -lactams were detected with dominance of the gene encoding the extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M (CTX-M-15 and CTX-M-3), and emergence of new genes; (blaSHV-12), blaTEM (blaTEM-167), blaCMY (blaCMY-16, blaCMY-2), other aminoglycoside resistance genes (armA and rmtB for the first time in Algeria, aac (3 ') - II, aac (6 ') - Ib, aadA and aadB), quinolones (qepA1, qepA3 and oqxAB for the first time in Algeria, aac (6') - Ib-cr, qnr (A, B, S, C, D) at trimethoprim / Sulfamethoxazole (dfr and sul) and colistin (mcr-1 for the first time in Algeria) were also detected. These results show that the frequency of these multidrug-resistant bacteria is worryingly increasing in our healthcare establishments and their emergence represents a serious therapeutic and epidemiological problem, hence the need for the establishment of an environmental monitoring system. Hospital microbial and strict application of hygiene measures.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, antibiotics, antibiotic resistance, Western Algeria.

## ملخص

تعد بكتيريا *Enterobacteriaceae* واحدة من العائلات الرئيسية للعصيات سالبة الجرام المسؤولة عن العدوى البشرية الخطيرة. تعتبر مراقبة الحساسية للمضادات الحيوية في المستشفى خطوة أساسية؛ حيث يوجه اختيار العلاجات التجريبية ويجعل من الممكن تقليل ضغط الاختيار الذي تمارسه المضادات الحيوية. في هذه الدراسة تم تحليل 7 مقالات. تشير هذه المقالات إلى بيانات نمطية وجزئية عن سلالات البكتيريا المعوية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة، المعزولة من ثلاثة مستشفيات جامعية كبيرة في غرب الجزائر (مستشفى جامعة سيدي بلعباس، مستشفى جامعة تلمسان ومستشفى جامعة وهران).، بما في ذلك لبيبتالاكتامين، أمينوغليكوزيدات، كينولون، تريميثوبريم / سلفاميثوكسازول وكوليسيتين بطرق مختلفة عن معدلات مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم الكشف عن جينات مختلفة لمقاومة بيتا لاكتامين مع سيطرة الجين المشفر للطيف الممتد لبيبتالاكتاماز (BLSE) CTX-M (CTX-M-3 و CTX-M-15) وظهور جينات جديد (*bla*<sub>SHV-12</sub>)، (*bla*<sub>TEM-167</sub>)، *bla*<sub>TEM</sub>، *bla*<sub>CMY-2</sub>، *bla*<sub>CMY-16</sub>، جينات آخر مقاوم للأمنوغليكوزيد (*armA*) و (*rmtB*) لأول مرة في الجزائر، (*aadB* و *aadA* - *Ib* - *aac* (6') - *II* - *aac* (3') وأيضا الكينولونات (*qepA1* و *qepA3* و *oqxA*) لأول مرة في الجزائر (*aac* (6') - *Ib-cr*)، *qnr* (A,B,C,D,S)، كما تم الكشف عن إيميثوبريم / سلفاميثوكسازول (*dfr* و *sul*) والكوليسيتين (*mcr-1*) لأول مرة في الجزائر. تظهر هذه النتائج أن تواتر هذه البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة يزداد بشكل مثير للقلق في مؤسسات الرعاية الصحية لدينا ويمثل ظهورها مشكلة علاجية ووبائية خطيرة، ومن هنا تأتي الحاجة إلى إنشاء نظام مراقبة بيئي.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا *Enterobacteriaceae*، مضادات حيوية، مقاومة المضادات الحيوية، غرب الجزائر.

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....	01
<b>1. Les entérobactéries</b>	
1.1. Définition.....	03
1.2. Habitat.....	03
1.3. Pouvoir pathogène.....	04
1.3.1 Pathogène opportunistes.....	04
1.3.2 Pathogènes strictes.....	04
1.4. Les caractères bactériologiques.....	04
1.4.1 Caractères morphologiques.....	04
1.4.2 Caractères cultureux.....	04
1.4.3 Caractères biochimiques.....	05
1.4.4 Caractères antigéniques.....	05
1.5- Classification.....	06
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	06
1.5.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	07
1.5.3 <i>Citobacter freundii</i> .....	07
1.5.4 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	08
1.5.5 <i>Serratia marcescens</i> .....	08
1.5.6 <i>Proteus</i> .....	08
1.5.7 <i>Salmonella</i> .....	09
1.5.8 <i>Yersinia</i> .....	09
1.5.9 <i>Shigella</i> .....	10
<b>2. Antibiotiques.....</b>	<b>11</b>
2.1. $\beta$ -Lactamines.....	12
2.1.1 Généralité.....	12
2.1.2 Structure.....	12
2.1.3 Classification.....	13
2.1.4 Mécanisme d'action.....	15
2.2. Quinolones.....	16
2.2.1 Généralité.....	16
2.2.2 Structures.....	16
2.2.3 Classification.....	17
2.2.4 Mécanisme d'action.....	18
2.3. Aminoside.....	19
2.3.1 Généralité.....	19
2.3.2 Structure.....	20
2.3.3 Classification.....	20
2.3.4 Mécanisme d'action.....	21
2.4 Colistine.....	22
2.4.1 Généralité.....	22
2.4.2 Structure.....	22
2.4.3 Mode d'action.....	22
<b>3. Les Mécanismes de résistance des Entérobactérie aux Antibiotique.....</b>	<b>23</b>

# Table des Matières

---

3.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	23
3.1.1 Altération de la perméabilité membranaire.....	23
3.1.2 Système d'efflux.....	24
3.1.3 Modification de la protéine liant la pénicilline.....	
3.1.4 Résistance enzymatique par production $\beta$ -lactamases.....	25
3.1.4.1 Résistance enzymatique naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	26
3.1.4.2 Résistance enzymatique acquis des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	27
3.2 Résistance aux Quinolones.....	30
3.3 Résistance aux Aminosides.....	31
3.4 Résistance aux colistine.....	32

## Matériel et Méthodes

<b>1. Prélèvements.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2 Isolement et identification.....</b>	<b>36</b>
2.1 Galerie API 20E.....	36
2.2 MALDI-TOF MS.....	36
<b>3. Etude de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>37</b>
3.1 Antibiogramme.....	37
3.2 Détermination des CMI.....	38
<b>4. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>39</b>
4.1 Test de synergie.....	39
4.2 Test à la cloxacilline.....	39
<b>5. Détection et identification des gènes de résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>39</b>
5.1 Extraction de l'ADN.....	39
5.2 Amplification de l'ADN par PCR simple.....	40
5.3 Electrophorèse et révélation.....	40
5.4 Séquençage des produits d'amplification.....	40
<b>6. Typage moléculaire des souches multirésistantes.....</b>	<b>41</b>
6.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP).....	42

# Table des Matières

---

6.2 Typage par séquençage multilocus (Multi-locus sequence typing ou MLST).....	42
<b>7. Etude de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>43</b>
7.1 Conjugaison bactérienne.....	43
7.2 Transformation.....	43
7.3 Analyse des plasmides.....	44
7.4 Typage des plasmides.....	44
<b>1. Résultat.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>62</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>64</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>78</b>

# Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique

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

**BLSE** :  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou étendu

**CASE** : Céphalosporinase

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CTX-M**: Cefotaximase Munich

**Kb** : Kilo base

**PCR** Polymerase Chain Reaction

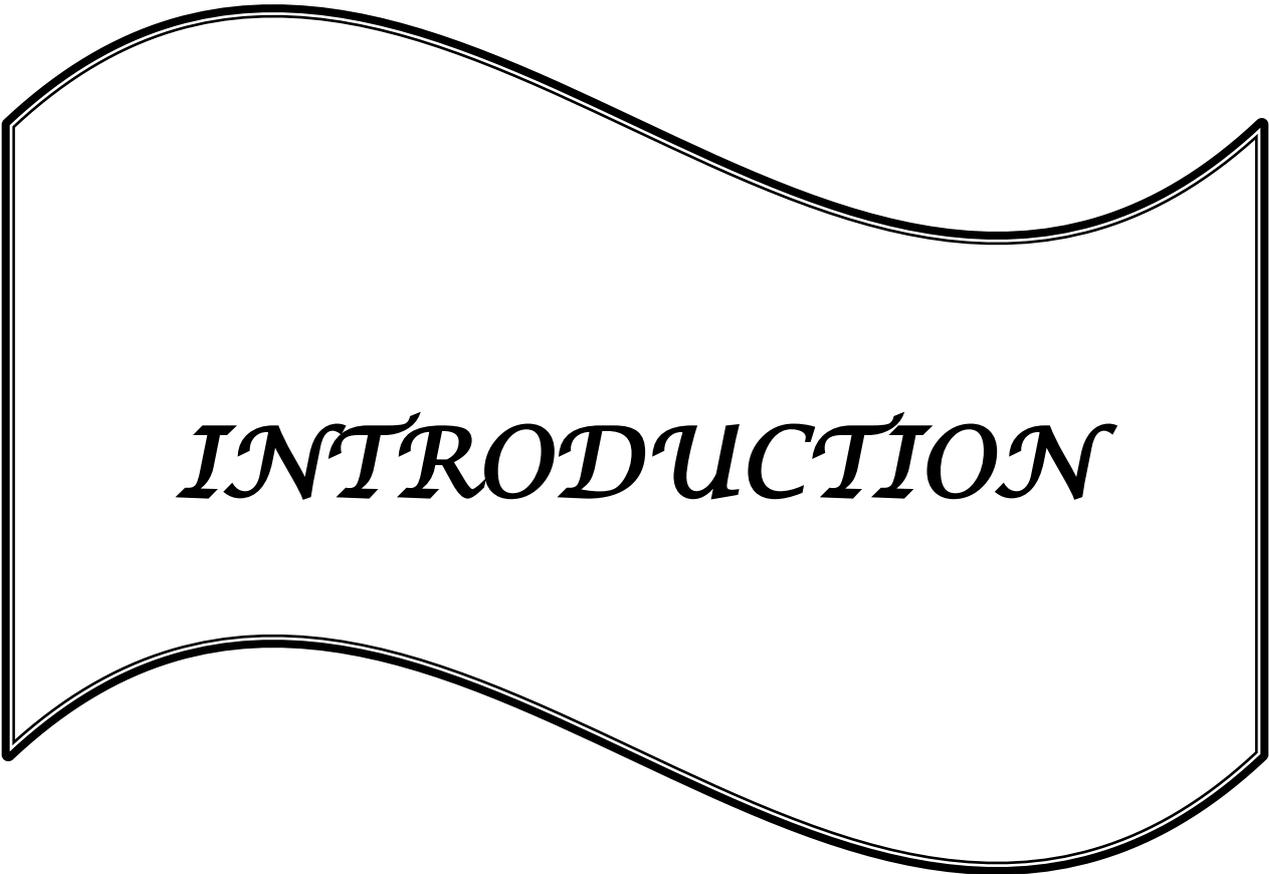
**$\mu\text{g/ml}$**  : Microgramme /millilitre

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cycle lactame.....	12
<b>Figure 2.</b> Principales structures des $\beta$ -lactamines.....	15
<b>Figure 3.</b> Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....	16
<b>Figure 4.</b> Structure chimique commune aux quinolones.....	17
<b>Figure 5.</b> Principales structures des quinolones.....	18
<b>Figure 6.</b> Mécanisme d'action des quinolones.....	19
<b>Figure 7.</b> Structure de base des aminoglycosides les plus utilisés en clinique.....	20
<b>Figure 8.</b> Structure des aminocyclitol, noyaux de base des aminoglycosides.....	21
<b>Figure 9.</b> Structure de la colistine A et B (polymyxine E1 et E2).....	22
<b>Figure 10.</b> Enveloppe d'une bactérie à Gram négatif <i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>Figure 11.</b> Mécanisme d'hydrolyse d'une $\beta$ -lactamine par une $\beta$ -lactamase.....	25
<b>Figure 12.</b> Action des $\beta$ -lactamases.....	26
<b>Figure 13.</b> Photo montrant une plaque API 20 <sup>E</sup> .....	36
<b>Figure 14.</b> Chromatogramme obtenu par la méthode de séquençage de Sanger (Chaque couleur correspond à l'une des 4 bases).....	41
<b>Figure 15.</b> L'analyse de la XbaI-digestion de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé.....	42
<b>Figure 16.</b> Profils plasmidiques des 4 espèces d'entérobactéries et de leurs transconjugants.....	46
<b>Figure 17.</b> Profils plasmidiques des souches d'entérobactéries et de leurs transconjugants....	48
<b>Figure 18.</b> L'analyse de la XbaI-digestion de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé.....	53
<b>Figure 19.</b> Dendrogramme des motifs générés par électrophorèse sur gel en champ pulsé d'isolats d' <i>Escherichia coli</i> <i>qepA</i> -positifs. PMQR, résistance aux quinolones à médiation plasmidique.....	58

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries.....	05
<b>Tableau2.</b> Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action.....	11
<b>Tableau 3.</b> Les prélèvements.....	33
<b>Tableau4.</b> Nombre de souches résistantes (%) aux autres classes d'antibiotiques en fonction des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	46
<b>Tableau 5.</b> Distribution des gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines et des déterminants de résistance associées chez les entérobactéries isolées au CHU de Tlemcen (Avril 2008 – Mars 2010).....	51
<b>Tableau6.</b> Résistance aux Antibiotiques des $\beta$ -lactamases à spectre étendu productrices d' <i>Escherichia coli</i> isolées de trois hôpitaux de l'ouest Algérie.....	55
<b>Tbleau7.</b> Caractéristiques des souches d' <i>E. coli</i> productrices d'ARNr méthylase 16S isolées dans les hôpitaux de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran, Algérie.....	56
<b>Tableau8.</b> Caractéristiques des souches d' <i>E. coli mcr-1</i> -positives et d'un <i>E. coli</i> transconjugant par test de sensibilité aux antibiotiques.....	57



# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

---

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques concerne toutes les espèces bactériennes. L'émergence et la diffusion des bactéries multirésistantes est un phénomène complexe, évolutif et inquiétant. La situation pour les entérobactéries dont la prolifération de leur résistance pose un grave problème de santé publique à l'échelle mondiale ; un problème dont les conséquences pourraient bien s'avérer irréversibles (**Grimont F et Grimont P.A.D. 2006**).

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif, qui sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts (**Mirabaud, 2003**). Les espèces de cette famille ont été depuis une vingtaine d'années largement exposées à une utilisation extensive des antibiotiques. (**Péan *et al.*, 2001**).

La résistance chez les *Enterobacteriaceae* aux  $\beta$ -lactamines est de plus en plus fréquente et est habituellement médiée par la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), qui est un problème particulier dans le traitement des infections à entérobactéries, mais d'autres mécanismes ont également émergé, conduisant à la multirésistance et menaçant de créer des espèces pan-résistants (**Paterson, 2006**).

Dans cet axe, dans notre étude, nous nous sommes fixés comme objectif une synthèse de sept (7) articles scientifiques concernant la résistance des *entérobactéries* aux antibiotiques au niveau de trois des plus importants centres hospitalo-universitaires (CHU) de l'ouest algérien, le CHU de Tlemcen, le CHU de Sidi Bel Abbes ainsi que le CHU d'Oran.

Ce mémoire est structuré en plusieurs parties : commençant par une synthèse bibliographique présentant les caractéristiques des entérobactéries ainsi que leurs principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques. Ensuite, seront présentés le matériel et les méthodes utilisés dans les articles analysés. Enfin, une synthèse des résultats et une discussion générales sur l'ensemble des articles, qui portent principalement sur la résistance d'entérobactéries aux antibiotiques dans l'ouest Algérien, des gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, aminosides et quinolones et la colistine ainsi que leur support plasmidiques et la détermination du lien de clonalité entre les souches étudiées.



*Première partie*

*Synthèse bibliographique*

## 1. Les entérobactéries

### 1.1. Définition

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Si le nom de famille est toujours maintenu, en revanche le classement des bactéries dans la famille a beaucoup évolué (**Joly et Reynaud, 2007**).

Les espèces constituant la famille des *Enterobacteriaceae* sont rassemblées en raison de caractères bactériologiques communs :

- Bacilles à Gram négatif ;
- mobiles par ciliatures péritriches (rarement immobile Exemple : *Klebsiella*) ;
- Se développent aisément sur milieux nutritifs en aéro-anaérobiose ;
- Acidifient le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- Ne possèdent pas d'oxydase ;
- Réduisent les nitrates en nitrites ;
- Catalase positifs (sauf *Shigella dysenteriae* de type 1) (**Denis et Ploy, 2007**).

### 1.2 Habitat

Les *Enterobacteriaceae* sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve aussi dans la cavité buccale au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux (**Fauchère et Avril, 2002**).

Ils peuvent persister en dehors d'organismes vivants dans la nature, on les retrouve également dans le sol et les eaux en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales animales et humaines et des eaux d'égout (**Avril et al., 2000**), aussi dans les produits alimentaires (produit laitiers, œufs, poissons,...) (**Lehner et al., 2011**). Elles sont : soit des bactéries pathogènes opportunistes, soit des bactéries pathogènes strictes (**Avril et al., 2000**).

## 1.3 Pouvoir pathogène

### 1.3.1 Pathogènes opportunistes

Ce sont des entérobactéries d'origine intestinale qui peuvent à des degrés divers devenir agressives pour l'Homme. La fréquence de leurs manifestations pathologiques est en augmentation, car souvent due à l'existence chez ces espèces de plasmides de résistance aux antibiotiques permettant leur sélection. Les pathogènes opportunistes les plus souvent rencontrés sont les bactéries des genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Serratia* (**Freney et al., 2006**).

### 1.3.2 Pathogènes strictes

Les pathogènes strictes sont représentés, par *Salmonella Typhi* responsable de la typhoïde, *Shigella dysenteriae* responsable de la dysenterie et *Yersinia pestis* agent de la peste. Leur mise en évidence dans un prélèvement clinique devra toujours être prise en considération. Ces microorganismes produisent des facteurs de virulence qui peuvent générer des infections très graves (**Tidrarine, 2019**)

## 1.4 Caractères bactériologiques

### 1.4.1 Caractères morphologiques

La taille des entérobactéries varie de 2 à 3 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large. Les espèces mobiles, les plus nombreuses, le sont grâce à une ciliature péritriche tandis que certaines sont immobiles (**Abbott, 2007**). Quelques-unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (**Bakhoun, 2004 ; Drame, 2001**).

### 1.4.2 Caractères cultureux

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37°C (**Denis et al., 2007**).

Sur les milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après des cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R) (**Avril et al., 2000**).

## 1.4.3 Caractères biochimiques

Comme les entérobactéries ont une morphologie très semblable, on utilise des tests biochimiques pour les identifier après un examen préliminaire de leur morphologie, de leur mobilité et de leur croissance. Parmi les tests les plus communément utilisés sont : le type de fermentation, l'utilisation du lactose et du citrate, la production d'indole à partir du tryptophane, l'hydrolyse de l'urée et la production de sulfure d'hydrogène (**Dedet, 2007**).

Le tableau ci-dessous résume les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés :

**Tableau 1** : Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries. (Decoster et Lahieu, 2006)

	Glu	Lac	ONPG	Ind	VP	Cit	Mob	Urée	PDA	H2S
<b>Escherichia</b>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>Citrobacter</b>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+/-
<b>Enterobacter</b>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<b>Klebsiella</b>	+	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-
<b>Serratia</b>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<b>Salmonella</b>	+	-	-	-	-	+/-	+	-	-	+
<b>Shigella</b>	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
<b>Proteus</b>	+	-	-	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-
<b>Providencia</b>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<b>Yersinia</b>	+	-	+	+/-	+	-	+	+	-	-

Glu : Glucose, Lac : Lactose, Ind : Indol, VP : Voges Proskauer, Cit : Citrate, Mob : Mobilité, PDA : Phenylalanine deaminase, ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside, H2S : Thiosulfate.

## 1.4.4 Caractères antigéniques

Les entérobactéries se caractérisent toutes par des antigènes (Ag) de paroi (somatiques) ou antigènes O. Les entérobactéries mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelle (« flagellaires») ou antigènes H. Enfin, certains possèdent un antigène de capsule ou antigène K (**Prescott *et al.*, 2003**).

## 1.5 Classification

Les entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans :

Règne : *Eubacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Camma-proteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae* (Meyer *et al.*, 2004).

La famille des entérobactéries se compose d'environ 40 genres et plus de 100 espèces dont les plus isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Avril *et al.*, 2000).

### 1.5.1 *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* représente l'espèce type de genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille » cette espèce possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. La production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer négative) (Joly et Reynaud, 2007).

*E. coli* se trouve en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante (Ahoyo *et al.*, 2007 ; Bonacorsi *et al.*, 2001).

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) (CHU-PS, 2003).

*E. coli* est une cause majeure de diarrhée aiguë dans le monde (**Berche, 2003**). À côté des infections intestinales, elle est responsable d'infections extra-intestinales diverses : urinaires, abdominale, méningées et les bactériémies (**Fauchère et Avril, 2002**).

### 1.5.2 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* est un bacille immobile, aéro-anaérobie, à Gram négatif, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes. Ce sont des bactéries non sporulées, d'aspect muqueux des colonies, ayant une oxydase négative, nitrate réductase positive, uréase positive, Réaction de Voges-Proskauer positive (VP+) et qui fermente le glucose avec production de gaz (**Janda et Abbott, 2006**).

*K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste responsable d'infections communautaires et d'infections nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections broncho-pulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (**Carpenter, 1990**). Cette espèce est également responsable d'infections intra-abdominales et est isolée du mal perforant plantaire.

*K. pneumoniae* est surtout un agent d'infections nosocomiales (**Podschun et Ullmann, 1998**), responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies, de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales (**Stone et al., 2003**).

### 1.5.3 *Citrobacter freundii*

*Citrobacter freundii* est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches (**Abbott, 2007 ; Knirel et al., 2002**).

Ces bactéries fermentent le mannitol et produisent du H<sub>2</sub>S gazeux ; elles sont aussi capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone (**Chen et al., 2002 ; Knirel et al., 2002**). Le réservoir de ces bactéries est l'intestin de l'humain et des animaux, sol, eau, eaux usées et aliments (**Doran, 1999**).

Les *Citrobacter freundii* sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares (**Ryan, 2004**), qui entraînent des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales (**Pepperell et al., 2002**), comme la méningite, le sepsis néonatal, l'infection articulaire et la bactériémie (**Doran, 1999**).

### 1.5.4 *Enterobacter cloacae*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs qui se déplacent grâce à des flagelles péritriches et sont dotés de pilus de classe 1 (**Hart, 2006 ; Paterson et al., 2005**). Ils produisent un acide à partir de la fermentation du glucose, leur température optimale de croissance est de 30 °C. Quatre-vingts pour cent des *Enterobacter* sont encapsulés (**Hart, 2006**).

*E. cloacae* est fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales et colonise généralement la flore intestinale endogène des patients hospitalisés, mais peut également se trouver comme source d'épidémie ou de diffusion de patient à patient (**Qureshi et al., 2011**).

*E. cloacae* est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (**Iabadene et al., 2010**). Elle peut causer également de nombreux types d'infections telles que les abcès cérébraux, les septicémies, des infections de plaies, des infections de la cavité abdominale ou des intestins (**Farmer et al., 2007**).

### 1.5.5 *Serratia marcescens*

*S. marcescens* est un bacille à Gram négatif aéro-anaérobie facultatif, mobile par ciliature péritriche, asporulée (**Jean-Jacques Lefrere, 2000**) et acapsulée mais certaines études ont montré que la capsule peut être formée quand les souches sont cultivées en aérobiose sur un milieu de culture qui contient de faible quantité de nitrogène et de phosphate (**Embrey, 2004**).

Cette bactérie est considérée comme pathogène opportuniste, elle touche le personnel hospitalier ou les patients au niveau de certaines muqueuses telles que le nez, la gorge et le tube digestif (**Byrne et al., 2001 ; Christensen et al., 1982**). Cette espèce fait partie des entérobactéries qui présente une résistance aux agents physicochimiques, elle peut survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques : ammoniums quaternaires et chlorhexidine. Elle se multiplie bien à +4°C, elle est inactivée par la chaleur humide à 121 °C pendant au moins 20 min et la chaleur sèche à 165-170 °C pendant 2 heures (**Mahlen, 2011 ; Avril et al., 1992**).

### 1.5.6 *Proteus*

Les *Proteus* sont largement répandues dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. Le genre *Proteus* rassemble cinq espèces (**Lamnaouer, 2002**) dont 3 espèces importantes pour l'homme, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* (**Goubau et Pellegrims, 2000**). Certaines espèces comme *Proteus mirabilis* et

*Proteus vulgaris* ont une propriété très connue de s'étaler très rapidement sur boîte de gélose : c'est le phénomène de swarming (**Pelmont, 2005**).

*Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. (**Lamnaouer, 2002**). Après *Escherichia coli*, elle est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine aussi d'infections nosocomiales (**Mahrouki et al., 2009**).

### 1.5.7 *Salmonella*

Kauffmann, le pionnier de l'analyse du genre *Salmonella*, avait individualisé sur la base de tests phénotypiques et de tests sérotypiques plusieurs sous-genres et de très nombreuses espèces de *Salmonella* (par exemple, *Salmonella typhi*, espèce responsable de la fièvre typhoïde) (**Weill, 2009**). Depuis 2005, une nouvelle nomenclature est en vigueur sur le plan international (**Tindall et al., 2005**). Elle fait suite aux études moléculaires (hybridations ADN-ADN) qui ont révélé la présence de seulement deux espèces dans le genre *Salmonella* (*S. enterica*, espèce majoritaire et *S. bongori*, espèce rare). *S. enterica* est elle-même subdivisée en six sous-espèces. L'espèce *bongori* et les différentes sous espèces d'*enterica* sont ensuite subdivisées sur la base du sérotypage en de très nombreux sérotypes. À ce jour, plus de 2500 sérotypes (ou sérovars) sont décrits (**Popoff, 2001**). Le réservoir des bactéries du genre *Salmonella* est principalement le tube digestif des vertébrés. De très nombreuses espèces animales hébergent ces agents pathogènes (volailles, bovins, porcs, poissons, reptiles,...). La sous-espèce *enterica* est plutôt adaptée aux animaux à sang chaud et à l'homme (**Weill, 2009**). Les salmonelles sont responsables de fièvres typhoïdes et de salmonelloses non typhiques qui représentent une cause majeure de diarrhées dans le monde avec un taux important de mortalité infantile (**Dagnra et al., 2007**).

### 1.5.8 *Yersinia*

Ces bactéries ont une croissance plus lente que celle des autres entérobactéries. Elles ont toutes un tropisme pour les tissus lymphoïdes. On les rencontre dans diverses espèces animales et plus particulièrement chez les rongeurs (**Nauciel, 2000**). Ce genre bactérien comprend 3 espèces pathogènes pour l'homme : *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. *Yersinia pestis* est l'agent causatif de la peste. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont des agents pathogènes d'origine alimentaire, répandus dans l'environnement et fréquemment isolés à partir d'animaux infectés (**Branger et al., 2009**).

### ***1.5.9 Shigella***

Ce sont des pathogènes strictes des humains et sont sous forme de courts bâtonnets de 2 à 3 µm de long, immobiles, aflagellés, non encapsulés. Leur température optimale de croissance est de 37°C en milieu aéro ou anaérobie. Elles sont peu résistantes en milieu extérieur, ne produisent pas de gaz lors de la fermentation du glucose et ne dégradent pas le glucose (**Xavier *et al.*, 2007**).

La propagation de *Shigella* s'effectue par voie féco-orale directe interhumaine du malade à son entourage par les mains sales. L'eau de boisson contaminée et les aliments souillés (lait, crèmes glacées, salades, produits carnés, etc.) par des déjections contenant *Shigella* représentent l'autre source traditionnelle de contamination, dite indirecte (**Aumaître *et al.*, 2004**).

La propriété essentielle de *Shigella* est sa capacité complexe à envahir l'épithélium rectocolique. Ce processus déterminant résulte de caractéristiques bactériennes, le pouvoir de pénétrer dans les entérocytes, de s'y multiplier, de se répandre aux autres cellules, puis d'induire une intense réaction inflammatoire de la muqueuse et la destruction tissulaire. De plus les shigelles résistent aux effets destructeurs des acides *in vitro* et *in vivo*. Cette résistance facilite la propagation digestive intraluminale de la bactérie et contribue à sa pathogénicité (**Xavier *et al.*, 2007**).

## 1. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules à faible concentration produites par des champignons, des bactéries, ou par synthèse capables d'inhiber la réplication d'une bactérie (antibiotique bactériostatique) ou de la tuer (antibiotique bactéricide). (Courvalin *et al.*, 2001).

La classification des antibiotiques est basée sur 2 paramètres : leurs structures chimiques qui conditionne leurs principales propriétés bactériologiques, pharmacologiques et toxicologiques (Bosgiraud, 2003) et leurs sites d'action (Tableau 2)

**Tableau 2.** Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action. Adapté de Prescott *et al.*, 2010)

Mode d'action	Antibiotique
inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	$\beta$ -lactamines, Glycopeptides
Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique	Polymyxines
inhibition de la synthèse protéique	Macrolides Tétracycline Chloramphénicol Aminoside
inhibition de la synthèse des acides nucléiques.	Rifampicine, Quinolones
inhibitions des voies métaboliques d'acide folique.	Sulfamides Triméthoprim

Les majeures classes d'antibiotiques utilisées pour la thérapie des infections à entérobactéries sont : les  $\beta$ -lactamines, les quinolones, les aminosides et la colistine. Lors du traitement, ces antibiotiques peuvent être utilisés seuls ou en association selon le degré de résistance présenté par la bactérie (**Bert et Lambert-Zechovsky, 2000**)

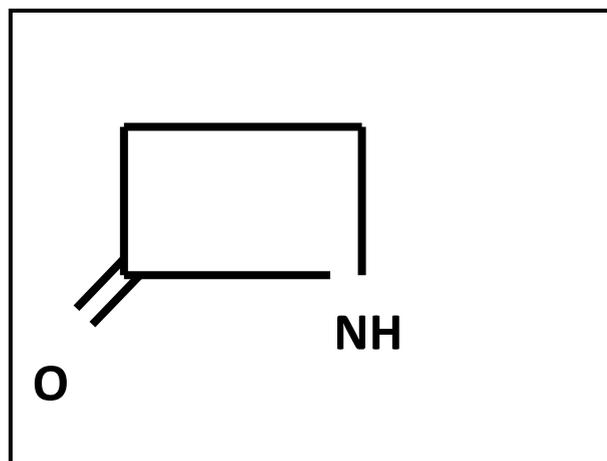
## 2.1. Les $\beta$ -lactamines

### 2.1.1 Généralités

Les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Il existe de nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamines, constituent la famille la plus fréquemment utilisée dans le monde, pour leur large spectre antibactérien, leur activité bactéricide, leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles (**Ferech et Coenen, 2006 ; Vander-Stichele *et al.*, 2006 ; Livermore, 1995**).

### 2.1.2 Structure

La base commune à toutes les  $\beta$ -lactamines (**Figure 1**) est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules (**Bryskier, 1999**).



**Figure 1.** Cycle lactame (Cavallo *et al.*, 2004)

### 2.1.3 Classification

Les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines sont classés en quatre sous-classes (**figure2**): pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames auxquelles il faut ajouter les inhibiteurs de bêta-lactamases, qui ne sont pas des antibiotiques sensus stricto mais des molécules permettant l'inhibition de certains mécanismes de résistance aux bêtalactamines utilisés par les bactéries (**Bryskier, 1999**).

#### -Pénème (pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau pénème, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle **thiazolidine**) associé au noyau  $\beta$ -lactame. Selon la nature de la chaîne latérale, on définit plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam).

#### - Céphème (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle  $\beta$ -lactame à un cycle **dihydrothiazine** (**Calderon et Sabundayo, 2007**) pour former le noyau céphème. Les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (**cavallo et al., 2004**)

#### -Pénème (carbapénèmes)

Se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle  $\beta$ -lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes : les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes (**Bryskier, 1999**).

#### -Monobactames

Représentés par l'aztréonam (**Le Noc, 1999**), qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies.

### -Des inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Le clavame (acide clavulanique) et les pénicillines-sulfones (tazobactam et sulbactam). Ces molécules sont des inhibiteur compétitifs des  $\beta$ -lactamases actives sur les pénicillines. Ce sont des  $\beta$ -lactamines à faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une  $\beta$ -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases (**Cavallo *et al.*, 2004**). 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 (**Ruppé, 2010**).

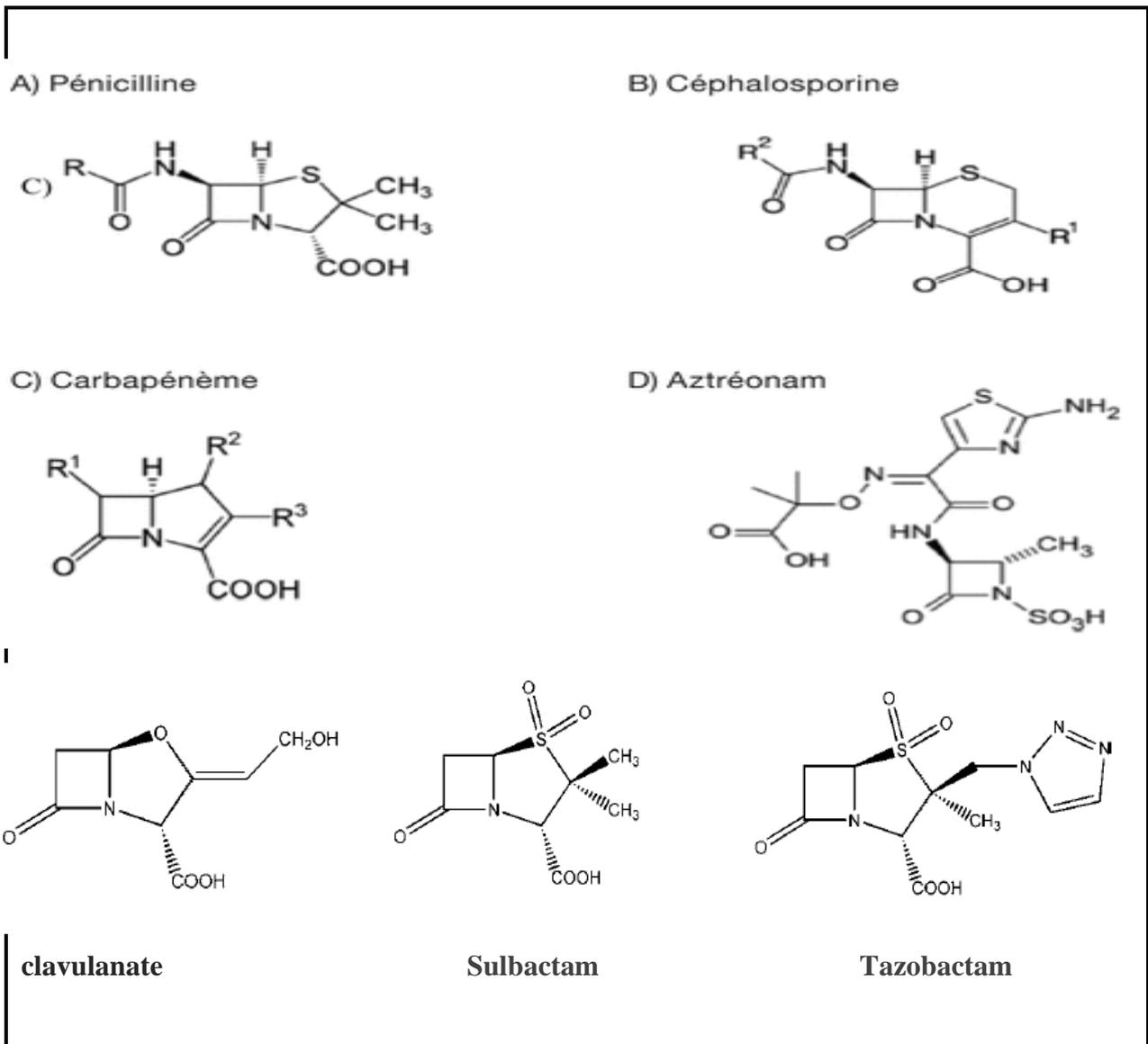


Figure 2. Principales structures des  $\beta$ -lactamines (Bonomo, 2006 ; Cavallo *et al.*, 2004)

### 2.1.4 Mécanisme d'action

Les  $\beta$ -lactamines, analogues structuraux de la terminaison peptidyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane (figure3), ont pour fonction d'interagir avec un groupe de protéines : Les PLPs, également appelées protéines de fixation de la pénicilline. Les PLP sont des transpeptidases qui interviennent dans la stabilisation du peptidoglycane en formant les liaisons inter-peptidoglycanes.

Le peptidoglycane est le constituant principal de la paroi de toutes les espèces bactériennes, et une inhibition de sa synthèse entraîne la mort de la bactérie par choc osmotique. De ce fait, les  $\beta$ -lactamines possèdent une activité bactéricide (**Kohanski *et al.*, 2007**).

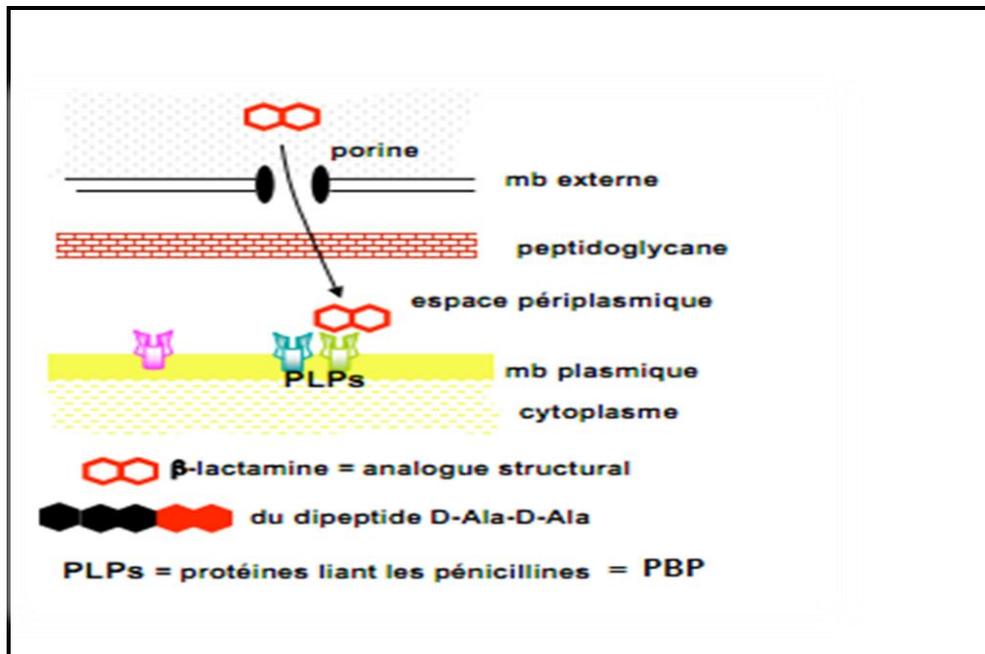


Figure 3. Mode d'action des  $\beta$ -lactamines (Verdet, 2011)

## 2.2 Les quinolones

### 2.2.1 Généralité

Les quinolones sont une des trois principales familles d'antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine. Ce sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, chef de file des quinolones classiques, longtemps indiquées dans le traitement des infections urinaires (**Honoré *et al.*, 2006**).

### 2.2.2 Structure :

La structure chimique des quinolones (**Figure 4**) est un acide pyridine- $\beta$ -carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 (**Soussy, 2006**). Dans les

années 80, sont apparues les fluoroquinolones ou quinolones de 2ème génération par l'addition d'une molécule de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7, qui a augmenté l'activité de ces composés ainsi que leur absorption orale et leur distribution dans les tissus (Ball, 2000)

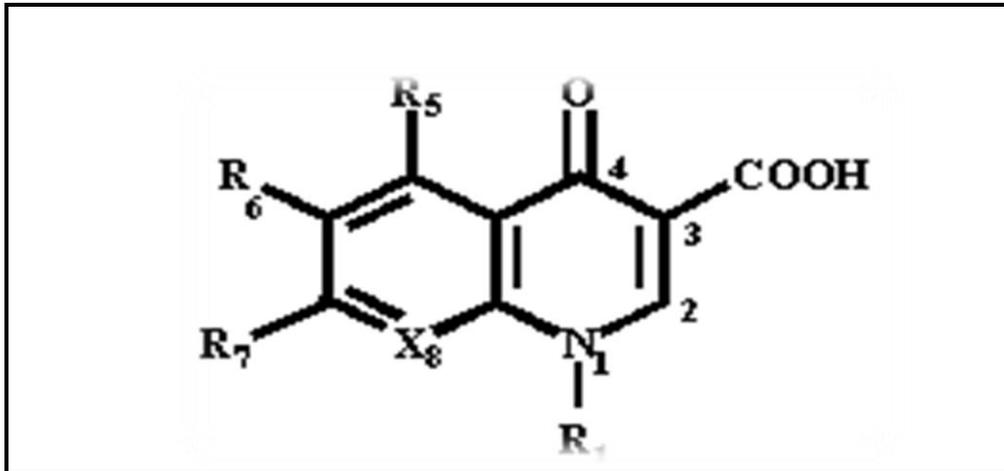


Figure 4. Structure chimique commune aux quinolones (Tulkens et spinewine, 2002)

### 2.2.3 Classification

Les quinolones sont classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de mise sur le marché (Figure 5) (Cattoir, 2012). On distingue :

- **Les quinolones de première génération** : Comprennent des molécules à spectre étroit, utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries (Andriole, 2005). Exemples : acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique
- **Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones**: Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones: présentent un spectre élargi à d'autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), à certains cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et aux bactéries intracellulaires. Exemples : norfloxacin, ofloxacin, péfloxacin, ciprofloxacin ;
- **Les quinolones de troisième génération ou fluoroquinolones anti-pneumococciques** : ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae*. Exemples : sparfloxacin, lévofloxacin, moxifloxacin.

- **Les quinolones de quatrième génération** : présentent un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies strictes. Exemples : trovafloxacin, gatifloxacin (Cattoir, 2012).

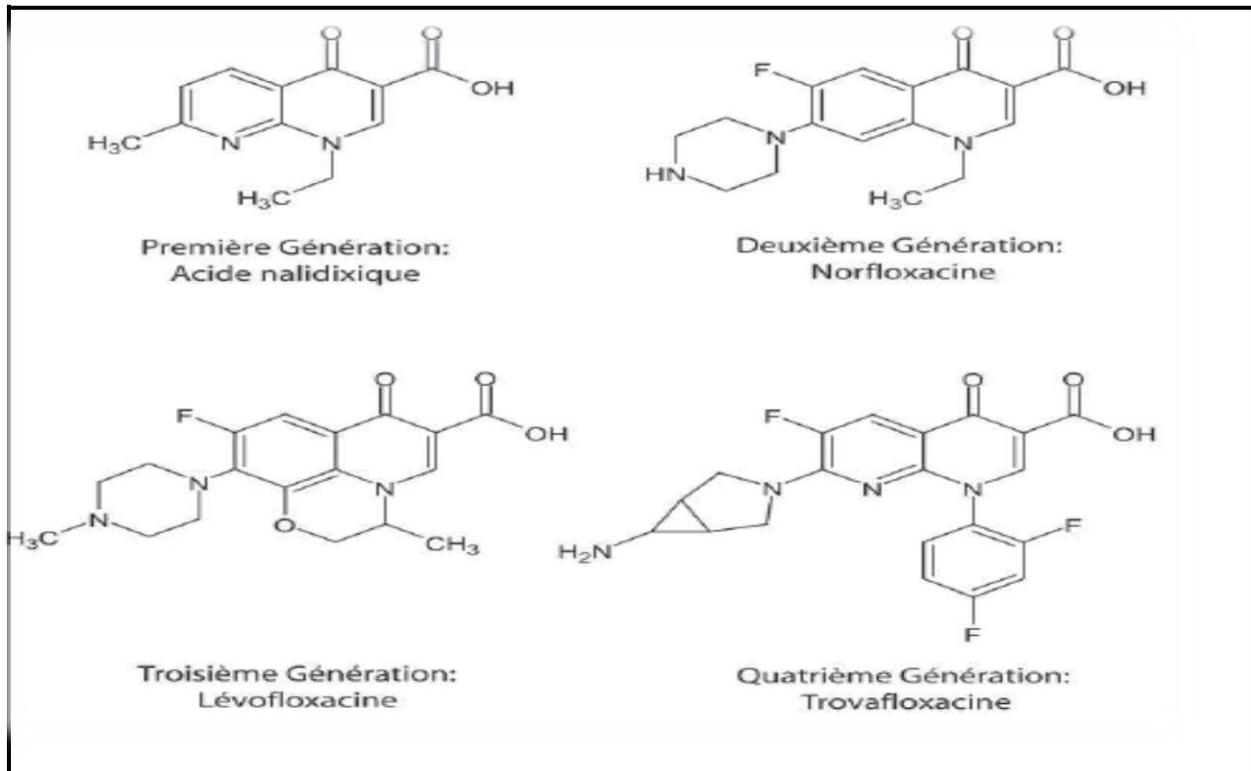


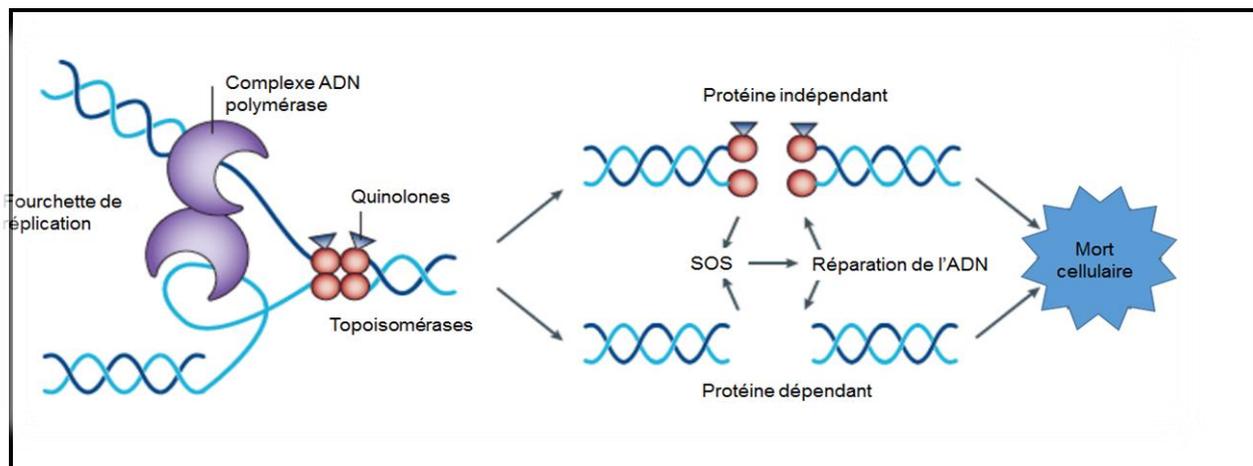
Figure 5. Principales structures des quinolones (Andriole, 2000)

### 2.2.4 Mécanisme d'action :

Les quinolones inhibent les topoisomérase de type II (gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN (**figure 6**) qui est nécessaire à sa réplication (**Hooper, 2001**). L'ADN gyrase introduit un super-enroulement négatif dans la double hélice d'ADN bactérien. Cette activité est essentielle pour l'initiation de la réplication de l'ADN ainsi que pour sa transcription

(**Levine et al., 1998**). La topoisomérase IV a une activité de décaténation, qui permet la séparation des chromosomes répliqués à la fin d'une séquence de réplication (**Zechiedrich et al., 1997**). Les quinolones interagissent avec le complexe enzyme-ADN (la Gyrase ou la topoisomérase IV) et

provoquent des changements conformationnels entraînant une désactivation de l'enzyme (**Drlica et Zhao, 1997**). Le complexe quinolone-enzyme-ADN ainsi formé, bloque la progression de la fourche de réplication ce 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 (**Drlica et al., 2008**).



**Figure 6. Mécanisme d'action des quinolones (adapté de Kohanski *et al.*, 2010)**

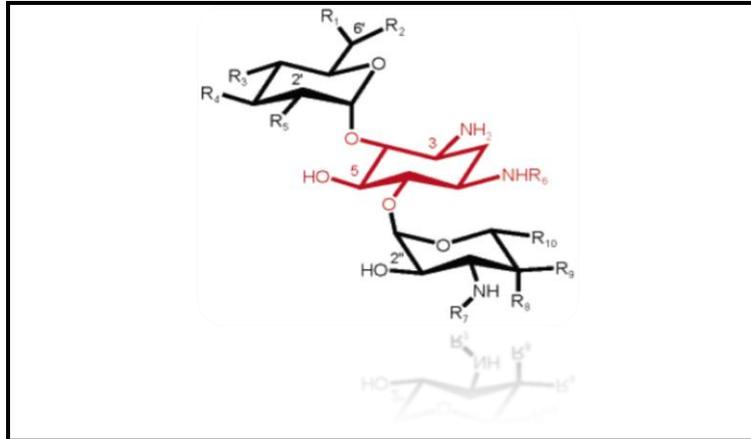
### 2.3 Aminosides ou aminoglycosides

#### 2.3.1 Généralité

Les aminosides, également appelés aminoglycosides sont des molécules naturelles produites par des actinomycètes ou en sont dérivés par hémisynthèse. Ils forment une classe d'antibiotiques qui conserve une place incontournable au sein de l'arsenal antibactérien hospitalier. Leur large spectre d'activité et leur effet bactéricide rapide constituent des atouts majeurs (**Nguyen et Lambert, 2012**).

## 2.3.2 Structure

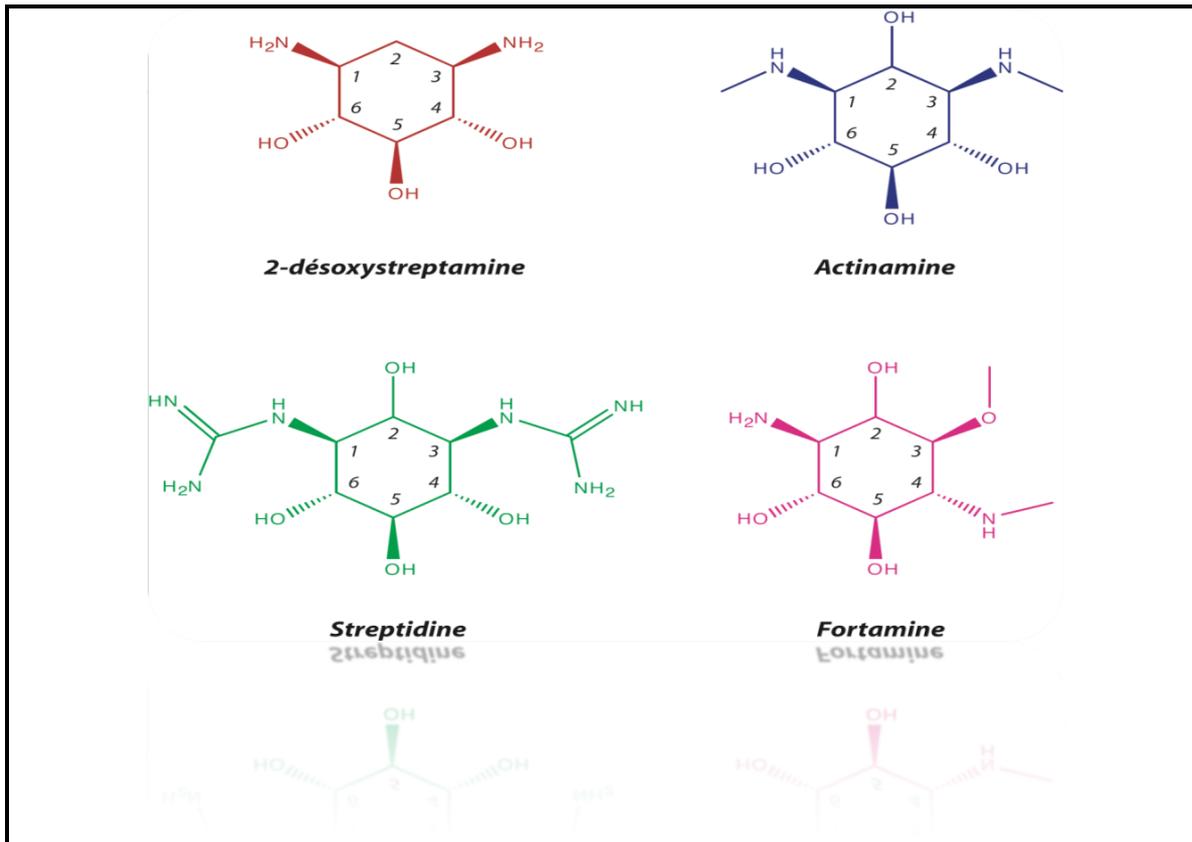
Structure de base comporte un cycle central aminocyclitol saturé, relié par des liaisons glycosidiques à deux ou trois hexoses (**figure7**) (**Vakulenko et Mobashery, 2003**).



**Figure 7. Structure de base des aminoglycosides les plus utilisés en clinique (Magnet et Blanchard, 2005).**

## 2.3.3 Classification

Le cycle central peut être la streptidine, l'actinamine ou la fortamine mais le plus souvent il s'agit de la 2-déoxystreptamine (DOS) (**Figure 8**). Les 2-DOS regroupent la plupart des composés utilisés en thérapeutique humaine comme : la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine (**Nguyen et Lambert, 2012**).



**Figure 8. Structures des aminocyclitol, noyaux de base des aminoglycosides (Vakulenko et Mobashery, 2003)**

### 2.3.4 Mode d'action :

Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Après fixation à des sites chargés négativement sur la paroi bactérienne, à cause de leur caractère polycationique, ils diffusent dans les bactéries à travers les porines jusqu'à l'espace périplasmique (Faure, 2009). Leur pénétration à travers la membrane cytoplasmique est active et nécessite un apport d'énergie et la présence d'oxygène. Les aminosides perturbent la synthèse protéique bactérienne en se liant au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (ARNr), dans la sous-unité 30S du ribosome (DuranteMangoni *et al.*, 2009). Cette liaison de l'antibiotique permet :

- ✓ l'inhibition de l'étape d'élongation (en empêchant le transfert du peptidyl-ARNt depuis le site A vers le site P) conduisant à un arrêt de la synthèse protéique
- ✓ l'introduction d'erreurs dans la lecture des codons de l'ARNm, engendrant la production de protéines aberrantes. C'est l'accumulation des protéines erronées synthétisées qui est responsable de la létalité induite par les aminosides.

## 4. Colistine

### 2.4.1 Généralité

La colistine est un polypeptide de la famille des polymyxines du groupe E, produit par *Bacillus polymyxa subsp colistinus*. Il s'agit d'un mélange complexe d'au moins 30 composés, dont les deux majeurs sont la colistine A (polymyxine E1) et la colistine B (polymyxine E2) (Frasca *et al.*, 2008). Cette famille d'antibiotiques fut découverte vers la fin des années 1940 plus précisément en 1947 avec (Benedict and Langlykke 1947, Falagas and Kasiakou 2005, Kwa *et al.* 2008).

### 2.4.2 Structure

Elle est constituée d'un décapeptide (10 acides aminés). Ce décapeptide contient trois acides aminés soit la D-leucine, la L-thréonine et l'acide L- $\alpha$ ,  $\gamma$ -diaminobutyrique (DAB). Sur le dernier DAB, on retrouve un lien amine qui le relie à un acide gras (Katz et Demain 1977, Storm *et al.*, 1977 ; Falagas et Kasiakou, 2005). Cet acide gras varie en fonction du type de 45 colistine : un 6-méthylheptanoyle dans le cas de la colistine A ou un 6-méthyl-octanoyle dans le cas de la colistine B (figure 9).

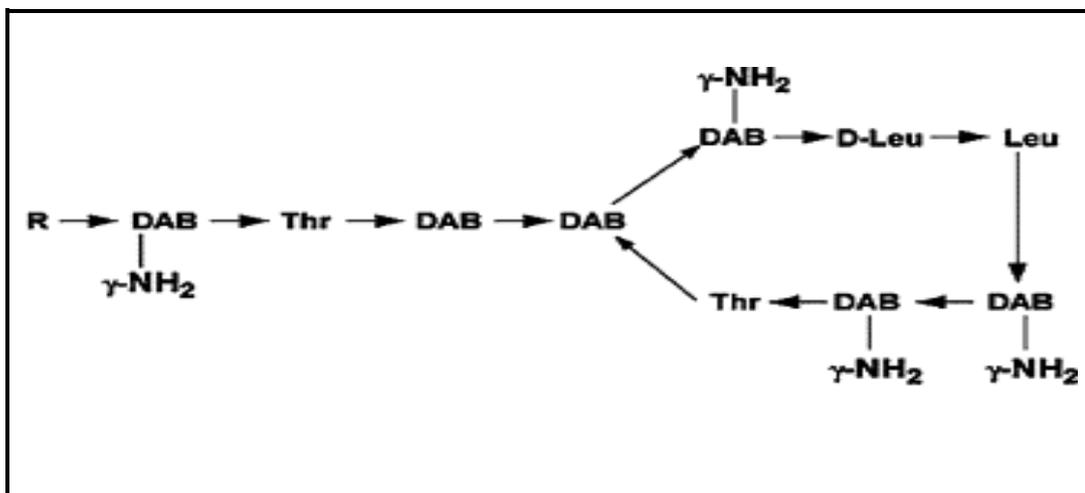


Figure 9. Structure de la colistine A et B (polymyxine E1 et E2) (Frasca *et al.*, 2008)

### 2.4.3 Mode d'action

La membrane externe diffère de la membrane interne par la présence de lipopolysaccharides (LPS) contrairement à la membrane interne qui se constitue de phospholipides. La colistine, de par ses charges positives (groupement NH<sub>2</sub>), possède une affinité pour la membrane externe des bactéries à Gram négatif et plus précisément pour les lipopolysaccharides (LPS) (Clausell *et al.*, 2007 ; Wang

et Quinn , 2010). L'interaction entre la colistine et le LPS provoque la liaison de ces deux structures. La colistine vient se lier au lipide A des LPS, puisque la colistine possède une affinité pour le LPS trois fois supérieure à celle des cations divalents magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et calcium ( $Ca^{2+}$ ) qui sont normalement présents dans la membrane externe et qui assurent ainsi la stabilité de celle-ci. Cette interaction provoquera le déplacement des cations  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  engendrant ainsi une perturbation dans la fonction de barrière de la membrane externe (Hancock, 1997). Il y'aura par la suite, formation de pores qui permettront aux contenus intracellulaires de s'échapper dans l'espace extracellulaire provoquant ainsi la mort de la bactérie (Falagas et Kasiakou, 2005 ; Yahav *et al.*, 2012).

### 3. Mécanisme de résistance des Entérobactéries aux Antibiotiques

#### 3.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines

Les mécanismes de résistance des entérobactéries, aux  $\beta$ -lactamines sont distinguer en quatre mécanisme parfois plus ou moins associés : défaut de pénétration par imperméabilité de la paroi bactérienne, excrétion de la molécule antibiotique, défaut d'affinité pour la cible (PLP), mais le principal mécanisme de résistance c'est la production d'enzymes inactivatrices, les  $\beta$ -lactamases, (Bonnet, 2006).

##### 3.1.1 Diminution de la perméabilité membranaire

La première ligne de protection de la cellule bactérienne contre tous les produits chimiques est la paroi cellulaire. La cellule des bactéries a Gram négatif, avec sa double couche de lipide asymétrique composée de lipopolysaccharides (LPS) et de phospholipides, forme une barrière presque imperméable pour les éléments hydrophiles et ralentit le transport de substances lipophiles (Molitor A,2010). Pour assurer que les substances nutritives nécessaires peuvent passer, la cellule possède des canaux de transport de nature protéique fortement sélectives appelées porines (Nikaido, 2003). Ces porines permettent l'échange du matériel nécessaire pour la survie des cellules mais ils permettent aussi aux antibiotiques comme les céphalosporines de traverser l'enveloppe bactérienne. Ainsi la perte ou la diminution de l'expression des porines limite l'entrée de certaines bêta-lactamines dans l'espace périplasmique et donc l'accès à la membrane interne où sont situées les PLP. Cette diminution de la perméabilité contribue à une résistance plus importante aux bêta-lactamines, si elle est associée à d'autres mécanismes (Thiolas *et al.*, 2005 ; De *et al.*, 2001).

## 3.1.2 Systèmes d'efflux (Pompes d'efflux) :

Les pompes d'efflux contribuent à la diminution de la concentration intracellulaire des composés toxiques comme les médicaments ou les détergents et sont par conséquent impliquées dans le contrôle de la sensibilité aux antibiotiques. Les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites (**figure10**) constituées d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protéine) (**Blair et Piddock, 2009**).

Chez les bactéries à Gram-négatif, l'imperméabilité de la membrane externe et les pompes à efflux jouent en synergie un rôle important dans la résistance intrinsèque de ces bactéries. Les mutations ou/et les modifications inductibles de ces mécanisme peut conduire à une diminution de l'afflux et l'augmentation de l'efflux des antibiotiques, ainsi d'empêcher l'accès des antibiotiques à leur cibles. Toutefois, les niveaux de résistance conférés par ces mécanismes devraient être faibles, mais ils sont renforcés par l'interaction entre les mécanismes non enzymatiques et enzymatiques (par production de  $\beta$ -lactamases) (**Li et al., 2007**).

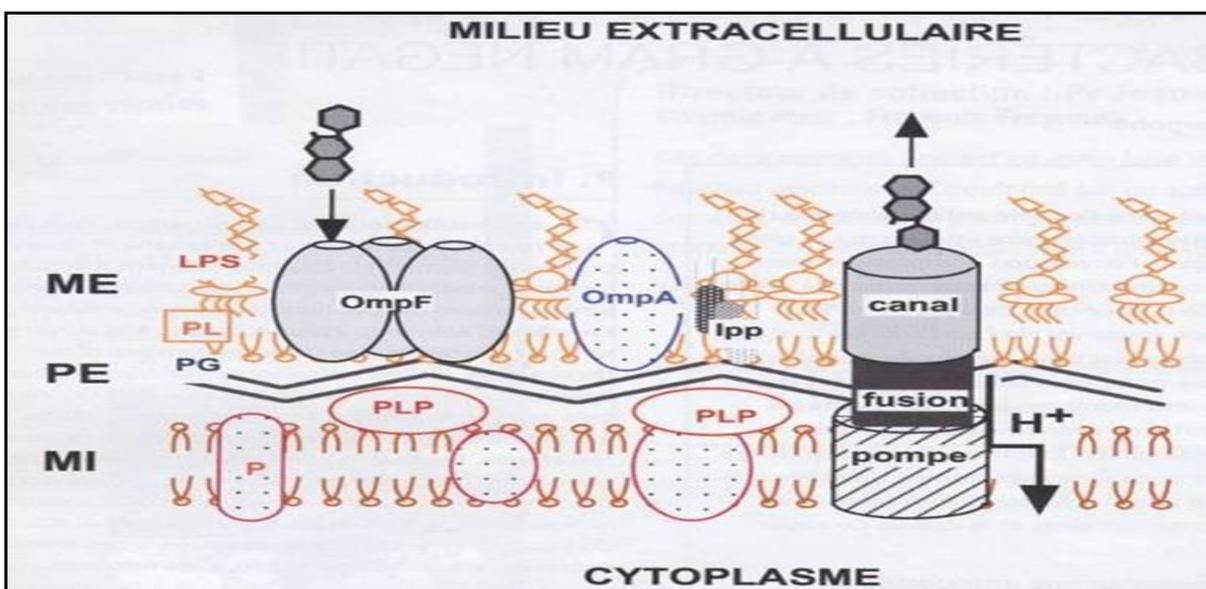


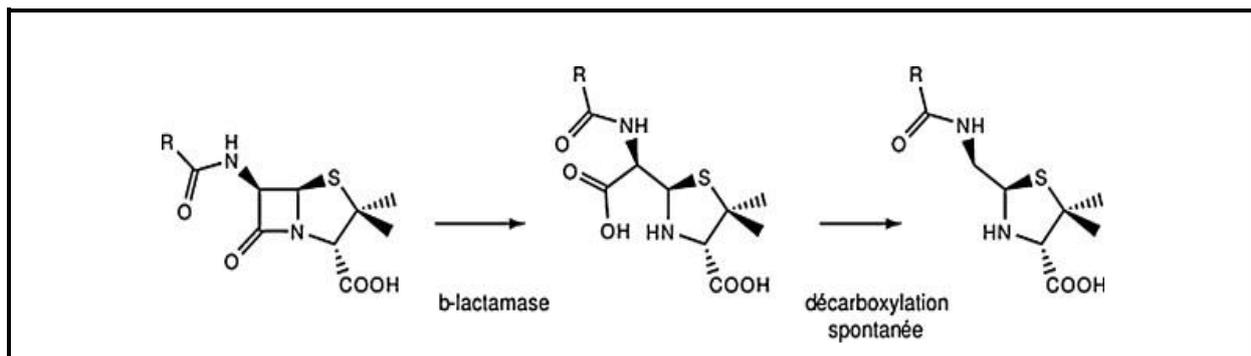
Figure 10. Enveloppe d'une bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (page et Carntol, 2003)

### 3.1.3 Modification de la protéine liant la pénicilline

La résistance aux  $\beta$  lactamines par altération de PLP a été décrite mais ne semble pas être un mécanisme prédominant chez les entérobactéries. Ainsi des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et aux mércillins ont été observés suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité PLP1A (Neurwirth *et al.*, 1995)

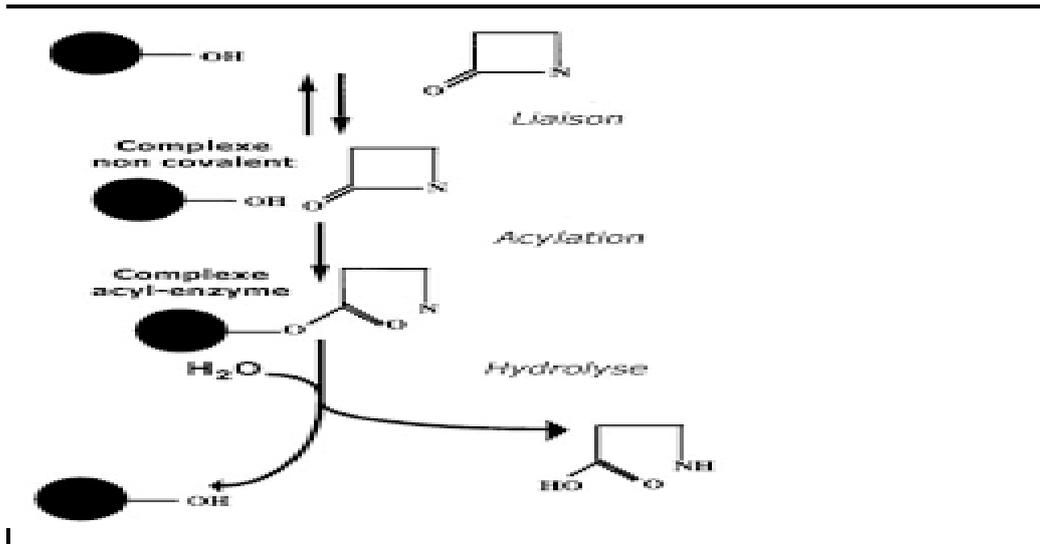
### 3.1.4 Résistance enzymatique par production $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle  $\beta$ -lactame (figure 11) en créant un intermédiaire acyloenzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (Ruppé, 2010).



**Figure 11. Mécanisme d'hydrolyse d'une  $\beta$ -lactamine par une  $\beta$ -lactamase (Ruppé, 2010)**

Une classification moléculaire des  $\beta$ -lactamases, impliquant la connaissance de la structure primaire des bêta-lactamines a été proposée par Ambler (Ambler, 1980) qui divise les bêta-lactamases en quatre groupes (A, B, C et D), qui présentent des différences sur le plan phylogénétique. Les  $\beta$ -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acétylation au cours de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo-bêta-lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques. Une classification fonctionnelle a été proposée par Bush *et al.* (Bush *et al.*, 1995), dans laquelle les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des bêta-lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent ces enzymes en quatre groupes (de 1 à 4) avec plusieurs sous groupes. (figure 12)



**Figure 12. Action des  $\beta$ -lactamases (Livermore, 1995)**

### 3.1.4.1 Résistance enzymatique naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

Les entérobactéries produisent naturellement diverses  $\beta$ -lactamases chromosomique (Livermore, 1995) se que permet a classer en sept groupes phénotypiques de résistances (bonnet, 2006).

#### **Groupe 0 : *Salmonella* et *Proteus mirabilis***

Les souches sauvages d'entérobactéries appartenant à ce groupe sont sensibles à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines et ne possèdent aucun gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

#### **Groupe 1 : *Escherichia coli* et *Shigella***

Les entérobactéries de ce groupe possèdent un gène chromosomique codant pour une céphalosporinase (AmpC) mais l'expression de ce gène est réprimée à l'état sauvage (céphalosporinase inductible muette). Les souches sauvages de ce groupe sont donc sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines mais une mutation sur le promoteur du gène *ampC* peut provoquer l'expression phénotypique de cette céphalosporinase chromosomique.

#### **Groupe 2 : *Klebsiella*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter koseri*.**

Espèces naturellement résistance aux aminopenicillines et carboxypenicillines du fait de la production a bas niveau de  $\beta$  lactamases chromosomique de classe A comme *k.pneumoniae* (SHV-

1 ,LEN-1).*K. oxytoca* (OXY) *citrobacter koseri* (COK). Le phénotypique commun a ce groupe est souvent appelé (pénicillinase a bas niveau) (**Jarlier et Nordmann, 2000**).

### **Groupe 3 : *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Serratia*, *Morganel la*, *Providencia*.**

Les entérobactéries de ce groupe productrices de céphalosporinase expriment une résistance naturelle de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines et des céphalosporines de première et de deuxième génération alors qu'il y a sensibilité vis-à-vis des carboxypénicillines. La céphalosporinase naturelle produite par les bactéries de ce groupe n'est pas inhibée par l'acide clavulanique. (**Ayad,2010**)

### **Groupe 4 : *Yersinia*.**

Dans ce groupe, on retrouve une expression naturelle d'une céphalosporinase et d'une pénicillinase naturelles de bas niveau : ce phénotype est caractérisé par résistance de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines, des carboxypénicillines, et des céphalosporines (C1G et C2G). Seule la pénicillinase est inhibée par l'acide clavulanique, donc la synergie est observée avec les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline) et l'acide clavulanique (**Ayad,2010**)

### **Groupe 5 : *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*.**

Ces bactéries expriment une résistance chromosomique naturelle Due à une céfuroximase (céphalosporinases inhibée par l'acide clavulanique) (**Ayad, 2010**).

### **Groupe 6 : *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Serratia fonticola***

Une BLSE souvent exprimer a bas niveau confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines ou carboxypénicillines aux C1G C2G. Pour les espèces appartenant a ce groupes une synergies est observe entre le C1G, et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (**philippon et Arlet, 2006**)

#### **3.1.4.2 Résistance enzymatique acquise des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines**

Les entérobactéries présentent fréquemment des résistances acquises aux antibiotiques à large spectre. Ces résistances sont souvent conditionnées par la présence de plasmides porteurs de déterminants de résistance multiples et transférables à d'autres bactéries à Gram négatif.

La réalisation de l'antibiogramme reste donc indispensable à la détermination des antibiotiques qui ont gardé leur efficacité sur le germe étudié et pouvant être utilisés dans le traitement de l'infection bactérienne.

### ❖ Pénicillinase de haut niveau ou acquise

Les pénicillinases des bacilles à Gram négatif sont nombreuses (TEM-1, TEM-2, SHV-1...) et non inductibles. Environ 75% de  $\beta$ -lactamases isolées des entérobactéries sont des TEM1. Ces enzymes sont codées par des plasmides et donc facilement transférables. Elles confèrent aux bactéries, qui les produisent à haut niveau, une résistance aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréido-pénicillines, amidino-pénicillines, C1G et de C2G. Cependant elles conservent leur sensibilité aux C3G, céfamycines, monobactames et carbapénèmes. Elles sont inhibées par les inhibiteurs enzymatiques (Collignon *et al.*, 2007).

### ❖ $\beta$ -lactamase à spectre étendu : BLSE

Les BLSE sont définies comme des enzymes, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006), capables d'hydrolyser et causer une résistance aux pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et les monobactames (aztréonam). Par contre, elle n'ont aucun effet sur les céphamycines (céfoxitine et céfotetan) et les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème). Ces enzymes sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases telle que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (Peirano et Pitout, 2010). Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes.

La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des premières  $\beta$ -lactamases connues (TEM-1, TEM-2 et SHV-1) (Paterson et Bonomo, 2005). Plus de 200 BLSE ont été décrites; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (Vidon et Bourdin, 2005). Les 4 familles majeures sont représentées par les enzymes de type TEM, SHV, OXA et CTX-M (Gniadkowski, 2001). Récemment, les BLSE de type CTX-M ont émergé comme le type le plus courant de BLSE, avec une répartition mondiale (Seonghan *et al.*, 2007). Découvertes pour la première fois au milieu des années 1980, elles montrent un niveau de dissémination dans les bactéries et partout dans le monde qui augmente

dramatiquement depuis 1995 (**Bonnet, 2004**). Les enzymes de la famille CTX-M comprennent aujourd'hui plus de 90 enzymes isolées de nombreuses espèces d'entérobactéries (**Ruppé, 2010 ; Bonnet, 2004**). Elles sont similaires aux autres  $\beta$ -lactamases à spectre étendu dans la mesure où elles hydrolysent à large spectre les céphalosporines et l'aztréonam mais agissant comme des cefotaximase.

### ❖ Les céphalosporinases chromosomiques de haut niveau

L'hyperproduction d'enzyme AmpC provoque une résistance à diverses  $\beta$ -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les céphalosporines de troisième génération, l'aztréonam et aux combinaisons des pénicillines avec les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Le mécilinam, les céphalosporines de quatrième génération (céfépime, cefpirome) et les carbapénèmes gardent leur activité sur les souches produisant ces enzymes (**Philippon et Arlet, 2006**). Cette hyperproduction peut se traduire par amplification du gène *ampC* (**Edlund et al., 1979**) ou des mutations dans le promoteur et / ou l'atténuateur, ce qui augmente le taux de transcription du gène (**Jaurin et al., 1982 ; Low et al., 2001**).

### ❖ Les céphalosporinases plasmidiques :

La première céphalosporinase plasmidique découverte aux états- unis chez *klebsiella pneumoniae* en 1987 (**papanicolau et al., 1990**). Après , plusieurs céphalosporinase ont été mis en évidence chez les entérobactéries, ces céphalosporinases plasmidique sont proches génétiquement a des céphalosporinases chromosomique ( **Rhimi-mahdjoubi et al.,2002 ; Miro et al.,2005 ; Ben Achour et al., 2007 ; Ding et al.,2008 ; Iabaden et al.,2009**) Des différences dans leurs séquences en acides aminés ont permis de les classer en plusieurs familles : CMY, ACT, ACC, DHA, FOX, MOX, LAT, MIR et CFE. Leur Le phénotype de résistance observé est similaire à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite (**Philippon et Arlet, 2006**).

### ❖ Résistance aux carbapénèmes

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches de bactéries résistantes également aux carbapénèmes (**Cuzon et al., 2010**). Chez les entérobactéries, cette résistance est principalement due à trois mécanismes (**Livermore Woodford, 2006**) :

- l'association entre la diminution de la perméabilité membranaire avec la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE (**Patel et al., 2009**). Chez les entérobactéries, une surproduction de céphalosporinase ou d'une BLSE associée à une perte de porine de la membrane externe et/ou une surexpression de pompes à efflux (**Castanheira et al., 2008**) est la cause la plus fréquente de résistance à l'imipénème (**Bonnet, 2006**) ;
- L'acquisition des métallo- $\beta$ -lactamases (VIM, IMP): ces enzymes, appartenant au classe B d'Ambler, hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamases à l'exception de l'aztréonam (**Trigoso, 2010**)
- Acquisition de non métallo- $\beta$ -lactamases : ces enzymes sont soit les oxacillinases (la classe D d'Ambler), soit les carbapénémases (classe A), inhibées par l'acide clavulanique, qui peuvent être codées par des gènes chromosomiques, décrits chez des souches de *Serratia marcescens* (SME1) et *E. cloacae* (IMI et NMC-A), ou plasmidiques comme certains variants de GES et carbapénémase (KPC) (**Nordmann et al., 2009; Pourriat et Martin, 2005**). Actuellement, les carbapénémases qui sont les plus répandues chez les entérobactéries sont les enzymes de type KPC. Ces enzymes ont principalement été décrites chez *Klebsiella pneumoniae* avec un support plasmidique. Elles possèdent un pouvoir de dissémination important et sont émergentes dans de nombreux pays (**Lautenbach et al., 2010 ; Walsh, 2010**).

### 3.2 Résistance aux quinolones

La résistance acquise à ces antibiotiques est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes. Pendant plus de 30 ans, les seuls mécanismes de résistance aux quinolones connus avaient un support chromosomique (**Skurnik et Andremont, 2006**)

Les mutations responsables sont localisées dans des gènes qui conduisent soit à:

- La perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible (mutation de la topoisomérase dans la région quinolone résistance determining région [QRDR])
- Une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme (par surexpression des systèmes d'efflux)
- Une diminution de sa pénétration transmembranaire (par déficit quantitatif ou qualitatif de la synthèse des porines) (**Nordmann et Mammeri, 2007**)

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où, Martinez- Martinez et al. ont décrit la première souche (*K. pneumoniae* UAB1) dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252). Trois types de déterminants de la résistance aux quinolones à médiation plasmidique (plasmidmediated quinolones résistance : PMQR) ont été identifiés à travers le monde dans des isolats cliniques d'entérobactéries (**Liu et al., 2008; Périchon et al., 2007; Yamane et al., 2007; Robicsek et al., 2006; Robicsek et al., 2006**) : les protéines Qnr qui se fixent sur les topoisomérases II et IV en compétition avec l'ADN et diminuent la fixation ultérieure des quinolones sur ces topoisomérases ; l'enzyme AAC (6')-Ib-cr qui confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine par acétylation enzymatique (**Robicsek et al., 2006b**) et les pompes d'efflux QepA (**Périchon et al., 2007**) et OqxAB (**Norman et al., 2008**).

### 3.3 Résistance aux aminosides

La modification enzymatique de l'antibiotique est le mécanisme de résistance aux aminosides le plus fréquemment observé chez les entérobactéries (**Shakil et al., 2008**). Trois familles d'enzymes modifiant les aminosides (AME) ont été décrites et classées en fonction de la réaction qu'elles catalysent : acétylation d'un groupement aminé (AAC: aminosides N-acétyltransférases), phosphorylation (APH: aminosides O-phosphotransférases) ou nucléotidylation (ANT: aminosides O-nucléotidyltransférases) d'un groupement hydroxyle (**Lambert, 2006**).

Les gènes codant les AME sont généralement trouvés en tant que gènes cassettes dans des intégrons, sur des plasmides ou des transposons, souvent associés aux gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux quinolones (**Ramirez et Tolmasky, 2010**).

Un autre mécanisme de résistance aux aminosides a été décrit. Il s'agit de la méthylation des nucléotides spécifiques, situés au niveau du site A de l'ARNr 16S, site de liaison des aminosides sur le ribosome, ce qui empêche la liaison de ces antibiotiques à la sous-unité 30S ribosomale (**Doi et Arakawa, 2007**) le premier gène codant une méthylase de l'ARNr 16S, nommé *armA*, a été identifié (**Galimand et al., 2003**) Depuis, onze déterminants de ces enzymes ont été détectés (*rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtD2, rmtE, rmtE2, rmtF, rmtG, rmtH et npmA*). Ces gènes sont généralement portés par des éléments génétiques mobiles retrouvés intégrés dans des plasmides transférables appartenant à divers groupes d'incompatibilité, ce qui a favorisé leur propagation mondiale (**Wachino et Arakawa, 2012**). Les méthylases ArmA et RmtB sont les plus fréquemment décrites (**Fritsche et al., 2008 ; Bogaerts et al., 2007; Yamane et al., 2007; Galimand et al., 2003**).

### 3.4 Résistance à la colistine

Afin de contrer l'action de la colistine, plusieurs bactéries ont développé différents mécanismes de résistance (**Falagas *et al.* 2010, Olaitan *et al.* 2014**). Chez les entérobactéries des mutations dans le système à deux composantes PmrA/PmrB entraînent l'activation de ce système de manière constitutive, résultant une modification continue des LPS et ainsi une résistance à la colistine (**Olaitan *et al.*, 2014**).

Le mécanisme général de résistance le plus décrit chez les entérobactéries est associé à la modification du lipide A du LPS. Cette modification entraîne l'ajout d'un groupement 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sur le lipide A, entraînant ainsi une augmentation de la charge du LPS et par le fait même une diminution de l'affinité pour la colistine. Un autre groupement est également ajouté au lipide A, le phosphoéthanolamine (pEtN). Ce groupement provoque également une augmentation de la charge, mais sans toutefois modifier la neutralité du LPS (**Chen et Groisman, 2013**).

En novembre 2015, un gène plasmidique transférable donne une résistance à la colistine a été décrit chez *E. coli* et *K. pneumoniae* en Chine (**Liu Y-Y *et al.*, 2016**). Il s'agit du gène *mcr-1*, codant pour une phosphoéthanolamine transférase, qui ajoute un groupement pEtN sur le lipide A comme ce qui a été observé pour les mutations chromosomiques. L'acquisition de ce gène confère un bas niveau de résistance à la colistine, difficilement détectable par les méthodes de diffusion en milieu gélosé. Le gène *mcr-1* a ensuite été décrit dans des entérobactéries d'espèces variées (*Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella...*) isolées chez l'homme, l'animal, dans l'alimentation et dans l'environnement (**Poirel *et al.*, 2017**). La découverte d'un autre gène plasmidique de résistance *mcr-2* chez *E. coli* a été rapportée en juin 2016 en Belgique (**Xavie *et al.*, 2016**), puis 6 autres gènes mobilisables entraînant la résistance à la colistine ont été observés entre 2017 et 2018 : *mcr-3* chez un isolat animal d'*E. coli* en Chine (**Yin *et al.*, 2017**), *mcr-4* chez *Salmonella* et *E. coli* chez le porc en Italie, en Espagne et en Belgique (**Carattoli *et al.*, 2017**), *mcr-5* chez *Salmonella paratyphi B* en Allemagne (**Borowiak *et al.*, 2017**), *mcr-6* chez *Moraxella spp* au Royaume-Uni (**AbuOun *et al.*, 2017**), *mcr-7* chez *Aeromonas spp* en Chine (**Yang *et al.*, 2018**) et très récemment *mcr-8* chez *K.pneumoniae* en Chine (**Wang *et al.*, 2018**). Ces résistances plasmidiques suggèrent la possibilité d'acquisition et de diffusion rapide de cette résistance, à l'instar de ce qui est connu pour d'autres mécanismes plasmidiques de résistance.



*Deuxième partie*  
*Matériel*  
*& Méthodes*

Dans cette étude 7 articles ont été analysés (Tableau 3). Ces articles reportent des données phénotypiques et moléculaires sur des souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques, isolées de trois grands CHU de l'ouest algérien (CHU de Sidi Bel Abbès, CHU de Tlemcen et CHU d'Oran).

### 1. Prélèvements

Articles et Lettres à l'éditeur	Auteurs et année	Période d'étude	Lieu d'étude	Nombre de prélèvement	Services concernés (Nombre)	Types de prélèvement
1- Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbès (Algérie)	Souna <i>et al.</i> , 2011	Octobre 2009 à mai 2010	CHU de Sidi Bel Abbès (Algérie)	250 (patient et environnement)	/	/
2- Résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées au CHU de Tlemcen (Algérie)	Ayad et Drissi, 2012	Octobre 2008 à avril 2009	CHU de Tlemcen	257	-Service de réanimation (139) -Autres services (118)	Patients (194) :
						-Plaies (97) -Prélèvements rectaux (38) -Aspirations trachéales (36) -Sondes vésicales (23)
3- Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial	Baba Ahmed <i>et al.</i> , 2013	Avril 2008 à mars 2010	CHU de Tlemcen	/	-Unité de soins intensifs - Service de	/

Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria)					chirurgie	
4- Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 $\beta$ -lactamases in Enterobacter cloacae strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria	Souna <i>et al.</i> , 2014	(2009 à 2011)	Trois CHU de l'ouest algérien (Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran)	/	-Unité de soins intensifs	Patients :
						-Plaies des postes opératoires -Sondes urinaires -Sondes trachéales
						Environnement hospitalier
5- Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases Producing <i>Escherichia coli</i> in Algerian Hospitals	Ayad <i>et al.</i> , 2016	Octobre 2008 à Juin 2012	Trois CHU de l'ouest algérien (Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran)	/	-Unité de soins intensifs -Service de chirurgie -Service de neurochirurgies	Patients :
						- Aspiration trachéale - Plaie - Ecouvillonnage rectal - Escarres - Urine - Sondes urinaire - Tube gastrique - Cathéter
						Environnement hospitalier

6-First detected Human Case in Algeria of <i>mcr-1</i> Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 <i>Escherichia coli</i> Isolate <sup>A</sup>	Berrazeg <i>et al.</i> ,2016	Octobre 2009 à décembre 2011	CHU de Sidi Bel Abbas	/	/	/
7-Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance <i>qepA1</i> Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing <i>Escherichia coli</i> from algeria	Yanat <i>et al.</i> ,2016	2011	CHU d'Oran	/	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Urine</li> <li>- Pus</li> <li>- Hémocultures</li> <li>-Spermatozoïde</li> <li>- Aspiration trachéale</li> <li>- Cathéter central</li> <li>- Liquide pleural et oculaire</li> </ul>

### 2. Isolement et identification

Les cultures ont été réalisées sur les milieux gélosé Mc Conkey et Clark et Lubs. L'identification des bactéries a été réalisée par galeries API 20E et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight).

#### 2.1 Galerie API 20 E

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) C'est une technique biochimique conventionnelle pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les Entérobactéries. l'API 20 E comprend 20 microtubes (**Figure13**). Ces microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification des souches est obtenue à l'aide d'un tableau d'identification du catalogue analytique.



**Figure13. Photo d'une plaque API 20E**

#### 2.2 MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry method) (Seng *et al.*, 2010)

La spectrométrie de masse est une technique d'identification des bactéries basée sur l'analyse de leurs protéines totales à partir de colonies isolées. De façon succincte, le spectromètre est composé de trois éléments principaux : une chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, 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 spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne.

### 3. Etude de la résistance aux ATB

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, (Antibiogramme) et par la méthode de dilution en milieu gélosé Mueller Hinton et microdilution dans le bouillon Mueller Hinton (CMI), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM**) pour les articles **1, 2, 3** et **4** ; et selon les directives de l'**Institut des Standard Cliniques et de Laboratoire (CLSI)** pour l'article **6** et **7**; et selon les recommandations du Comité européen de l'antibiogramme (**EUCAST**) pour l'article **5**.

#### 3.1 Antibiogramme

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante) et d'orienter l'antibiothérapie. Il consiste à disposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (**Soude, 2005**).

Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

Pour l'article 1 : l'imipénème et l'amikacine. ampicilline ,amoxicilline ,amoxicilline-acide clavulanique ,ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique ,pipéracilline ,pipéracilline/tazobactam, céfalotine ,céfuroxime, céfoxitine, ceftriaxone céfotaxime, ceftazidime, aztréonam ,céfépime et cefpirome ,tobramycine ,gentamicine , kanamycine, fluoroquinolones ,ofloxacine ,ciprofloxacine.

Pour l'article 2 : amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline + tazobactam, cefalotine , céfoxitine, ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime, aztréonam, et imipénème; gentamicine ,tobramycine ,amikacine acide nalidixique, Ciprofloxacine, colistine et triméthoprim/sulfaméthoxazole.

Pour l'article3:/

Pour l'article 4 : ticarcilline, pipéracilline, amoxicilline-clavulanique acid, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline -tazobactame, imipénème, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, aztreoname, gentamicine tobramycin, amikacine, acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine, colistine et triméthoprim-sulfaméthoxazole

Pour l'article 5 : amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline + tazobactam, céfoxitine , céfotaxime, ceftazidime, céfépime , aztréonam , ertapénème , imipénème, kanamicin, gentamicine, tobramycine , amikacine, nétilmicine, acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine, colistine et triméthoprime/sulfaméthoxazole

Pour l'article 6 : amoxicilline + acide clavulanique , ticarcilline + acide clavulanique , céfoxitine , Ceftriaxone , céfépime, aztréonam, imipénème, ertapénème, gentamicine, amikacine, ciprofloxacine , triméthoprime/sulfaméthoxazole, Rifampin, Fosfomycin et la colistine

Pour l'article 7 : amoxicilline, aztréoname, ceftazidime, céfotaxime, céfépime, céfoxitin, cotrimoxazole, tetracycline, amikacine, gentamicine et tobramycine.

### **3.2 Détermination des CMI (Souana, 2010)**

C'est est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques. Les antibiotiques testés sont :

Pour l'article 1 : l'imipénème, la céfoxitine, l'aztréonam, le céfotaxime, la ceftazidime, le céfépime, la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la rifampicine.

Pour l'article 2: /

Pour l'article 3 : ticarcilline, pipéracilline, céfotaxime, ceftazidime, imipénem, gentamicine, tobramycine et ciprofloxacine.

Pour l'article 4 : céfotaxime, ceftazidime céfépime, imipénem, gentamicine, amikacine et ciprofloxacine

Pour l'article 5 : colistine (microdilution dans le bouillon Muller Hinton)

Pour l'article 6 : Colistine

Pour l'article 7 : Ciprofloxacine et autres fluoroquinolones (microdilution)

### 4. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines

Plusieurs tests ont été réalisés pour détecter les phénotypes de résistances aux  $\beta$ -lactamines chez les souches étudiées les plus redondent sont :

#### 4.1 Teste de synergie

Cette technique, réalisée dans l'ensemble des articles, est utilisée pour la détection phénotypique de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. Sur gélose Mueller-Hinton, des disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et de 4<sup>ème</sup> génération (C4G) sont placés à 2 cm d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (**Jarlier *et al.*, 1988**). La présence d'une BLSE est caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (**Sirot, 1996**).

#### 4.2 Test à la cloxacilline (**De Champs, 2002; Naas, 2003**) (articles 1, 2, 3 et 4)

Pour certaines souches de bacille à Gram négatif, il est difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel l'hyperproduction de céphalosporinases des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE). En cas d'hyperproduction de céphalosporinases, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies indicatrices de BLSE. Un antibiogramme sur Mueller-Hinton additionné de la cloxacilline (souvent à 250  $\mu$ g/ml pour les entérobactéries) qui inhibe *in vitro* les céphalosporinases de la classe C d'Ambler chromosomiques et les céphalosporinases plasmidiques permet de restaurer l'activité des céphalosporines de troisième génération et de confirmer le phénotype céphalosporinase.

### 5. Détection et identification des gènes de résistance aux antibiotiques

#### 5.1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée par choc thermique. Une suspension bactérienne en eau pure est préparée à partir de colonies bactériennes jeunes sur milieu Mueller-Hinton puis centrifugée. Le culot repris dans l'eau pure a été porté à ébullition pendant 10 min, puis refroidi 10 min dans la glace. Après une dernière centrifugation le surnageant, contenant l'ADN bactérien, a été recueilli et conservé à basse température (**Souna, 2010**)

### 5.2 Amplification de l'ADN par PCR simple

La PCR (Polymérase Chain Réaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une méthode d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue présente dans un échantillon même en très faible quantité. Afin de déterminer les gènes de résistance aux antibiotiques, cette technique est utilisée pour la recherche des plusieurs gènes :

**L'article 1 :** /

**L'article 2 :** /

**L'article 3 :** gènes codant les  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>), les gènes de résistance aux quinolones (*aac*(3')-II, *aac*(6')-Ib-cr, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*).

**L'article 4 :** gènes codant les  $\beta$ -lactamines *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, et *bla*<sub>SHV</sub> *bla*<sub>ECB</sub>, et *bla*<sub>CMY-2</sub>.

**L'article 5 :** gènes codant les  $\beta$ -lactamines *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> et *bla*<sub>SHV</sub> et gènes codant la résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*).

**L'article 6 :** gène de résistance à la colistine *mcr-1*

**L'article 7 :** gènes de résistance aux quinolones *qnr*(A, B, S, C, D), *aac* (6c') *Ib-cr*, *qepA* et *oqxAB* ; gènes codant les  $\beta$ -lactamases *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> et *ampC* et gène de résistance aux aminosides *rmtB*.

### 5.3 Electrophorèse et révélation

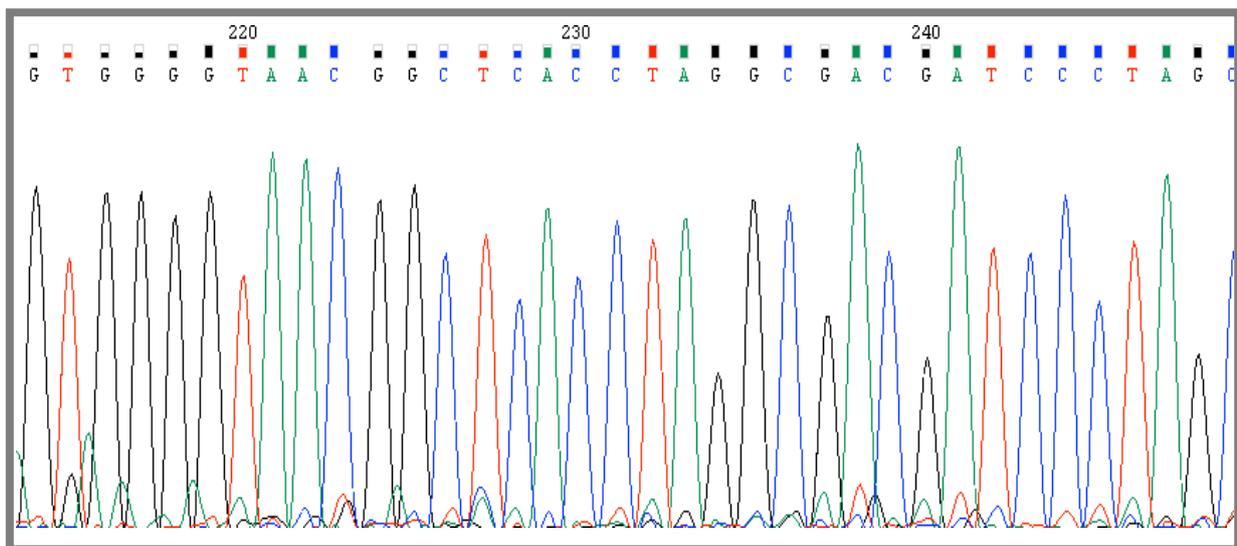
Après amplification, les produits de PCR obtenus sont mélangés au tampon de charge et soumis à une migration. Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans le gel en même temps que les échantillons. Le gel d'électrophorèse est coloré dans un bain de bromure d'éthidium avant révélation sous ultra-violets.

### 5.4 Séquençage des produits d'amplification (Sanger *et al.*, 1977)

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN amplifié. Les produits de PCR purifiés et dilués sont séquencés selon la méthode décrite par Sanger et ses collaborateurs (Sanger *et al.*, 1977). Il s'agit d'une méthode de séquençage par synthèse. L'élongation des brins d'ADN par la polymérase est stoppée de façon aléatoire suite à l'incorporation d'un

didésoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP). Chacun des 4 ddNTP, présent en faible proportion par rapport au dNTP correspondant, est marqué par un fluorochrome spécifique.

Les séquences nucléotidiques obtenues sont présentées sous forme d'un chromatogramme (**Figure14**) et sont analysées grâce aux différents logiciels puis comparées aux séquences déposées dans GenBank à l'aide du logiciel BLAST disponible sur le site web du centre national de l'information en biotechnologie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)



**Figure14. Chromatogramme obtenu par la méthode de séquençage de Sanger**  
(Chaque couleur correspond à l'une des 4 bases)

### 6. Typage moléculaire des souches multirésistantes

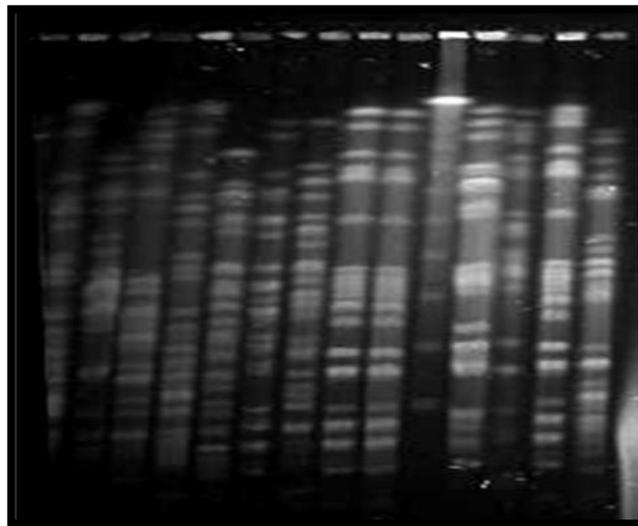
Afin de mettre en évidence une éventuelle clonalité entre les souches multirésistantes, techniques de typage moléculaire ont été réalisées : l'électrophorèse en champ pulsé pour l'ensemble des articles, le typage par séquençage multilocus (MLTS) pour les articles 1, 3, 4 et 6, rep-PCR et phylogénie d'*E. coli* pour l'article 3.

Les techniques les plus redondantes sont détaillées :

### 6.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

ECP est une méthode très performante en épidémiologie. Elle permet de comparer des souches bactériennes au sein d'une même espèce. Cette méthode a été développée par Schwartz et Cantor en 1984 (**Schwartz et Cantor, 1984**) afin de séparer les grandes molécules d'ADN ayant une taille supérieure à 50 kb. Dans cette technique, l'ADN bactérien est clivé par des endonucléases, enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupures, ce qui permet d'obtenir un nombre réduit de fragments d'ADN. Au cours de cette électrophorèse, l'ADN bactérien clivé est exposé à des champs électriques dont la polarité est alternée à intervalles de temps réguliers, permettant ainsi la séparation des fragments d'ADN de grande taille. La difficulté de cette technique, basée sur l'analyse du chromosome bactérien intact, réside précisément au niveau de la manipulation de ces molécules de grande taille qu'il faut éviter d'endommager lors de la préparation. Pour cela, les cellules bactériennes sont incluses dans une matrice semi-solide d'agarose appelée plug ou insert (**Grattard, 2007**).

Les profils de restriction obtenus (**figure 15**) sont révélés par immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium, puis photographiés sous lumière UV. Ils sont interprétés selon les critères proposés par Tenover (Tenover *et al.*, 1995) et les isolats sont classés en différents pulsotypes.



**Figure15 .L'analyse de la XbaI-digestion de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé.**

### 6.2 Typage par séquençage multilocus (Multi-locus sequence typing ou MLST)

La méthode de MLST est basée sur le séquençage des gènes de ménage « house keeping genes », caractéristiques de chaque espèce. Le choix de ces gènes repose sur leur variabilité allélique, l'absence de répercussions due à la pression de sélection de milieu extérieur et leur répartition homogène sur le chromosome. Ce sont pour la plupart, des gènes codant des enzymes du métabolisme intermédiaire (**Maiden *et al.*, 1998**).

Au sein d'une même espèce et pour chaque locus étudié, toute mutation relevée dans la séquence, définit un nouvel allèle ou variant allélique, auquel un numéro arbitraire est attribué. La combinaison des différents allèles fournit un profil allélique qui définit un type particulier pour chaque isolat, ou Séquence Type (ST). La combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (**Maiden, 2006**).

## 7. Etude de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques

### 7.1 Conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne est un mécanisme de transfert d'un plasmide conjugatif entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice nécessitant un contact physique entre ces deux bactéries par le biais d'un pili sexuel. La bactérie réceptrice ayant reçu le plasmide est appelée transconjugant (**Touati *et al.*, 2006**). La sélection des transconjugants s'effectue en présence de deux antibiotiques: un correspond à l'une des résistances transférées de la souche donatrice et l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice. Les transconjugants obtenus font l'objet de contrôle de sensibilité par méthode de diffusion et de réaction de PCR pour détecter les gènes de résistance. Cette technique a été réalisée dans l'ensemble des articles analysés.

### 7.2 Transformation

La transformation est un mécanisme de transfert du matériel génétique dans lequel l'ADN étranger pénètre dans une bactérie, celle-ci doit être dans un état physiologique particulier appelé état de compétence caractérisé par la présence à la surface de la bactérie des récepteurs d'ADN et de diverses protéines (protéines membranaires fixant l'ADN, nucléases...). Cet état particulier et transitoire de la paroi permet le passage trans-pariétal de l'ADN. Après pénétration, l'ADN étranger s'intègre dans le chromosome bactérien par recombinaison (Beaune, 2004). Les expériences de transformation sont réalisées par électroporation et les souches recombinantes sont sélectionnées sur gélose TS additionnée de ciprofloxacine à une concentration de 0.03 mg/l dans l'article 7, et sur gélose Mueller Hinton

contenant: la ticarcilline, le céfoxitine, et la ceftazidime a des concentration de 100µg/ml, 10µg/ml et 1µg/ml respectivement dans l'article 4.

### 7.3 Analyse des plasmides

L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée par la méthode de la lyse alcaline selon le protocole de Kado et ses collaborateurs dans les articles 1 et 2 (**Kado et Liu, 1981**) et selon le protocole de kieser dans l'article 5 (**kieser, 1984**). Les profils plasmidiques sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose. La taille des plasmides est estimée par comparaison avec des plasmides de taille connue de la souche *Escherichia coli* V 517 dans les articles 1 et 2.

### 7.4 Typage des plasmides

Les groupes d'incompatibilité permettent de caractériser les plasmides porteurs de gènes de résistance et de suivre leur diffusion. La détermination des groupes d'incompatibilité est réalisée par la méthode de PCR multiplex développée par l'équipe de Carattoli (**Carattoli et al., 2005**). Cette méthode a été appliquée aux souches multirésistantes et leurs transconjugants dans l'article 1 et 5.



*Troisième partie*  
*Résultats*  
*& Discussion*

## 1. Résultats

### Article 1. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbès (Algérie)

Auteurs : SOUNA Djahida, SEFRAOUI Imane, DRISSI Mourad

Au CHU de Sidi bel Abbès entre Octobre 2009 et Mai 2010, 140 souches d'entérobactéries sont collectées, ce qui correspond à une fréquence d'isolement de 56% (140 souches/ 250 prélèvements). L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches a montré une prédominance d'*Escherichia coli* (37.1%), suivie de *Klebsiella pneumoniae* (21.4%), de *Proteus spp.* (19.3%) et d'*Enterobacter cloacae* (18.6%). Les autres entérobactéries viennent en dernière position avec 5 isolats soit 3.6%.

Les résultats de l'antibiogramme et des CMI montrent une très bonne activité de l'imipénème et l'amikacine avec +95.7% et 96.4% de souches sensibles respectivement. Pour les autres antibiotiques les taux de résistances sont les suivants :

- Les  $\beta$ -lactamines : ampicilline (85%), amoxicilline (86.4%), amoxicilline/acide clavulanique (76.4%), ticarcilline (77.8%), ticarcilline/acide clavulanique (65%), pipéracilline (58.6%), pipéracilline/tazobactam (20.7%), céfalotine (62.8%), céfuroxime (58.6%), céfoxitine (29.3%), ceftriaxone (44.3%), céfotaxime (44.3%), ceftazidime (47.1%), aztréonam (39.3%), céfépime (38.6%) et cefpirome (42%)
- Les Aminosides: tobramycine (42.1%), gentamicine (38.6%) et kanamycine (35%)
- Les quinolones: acide nalidixique (46.4%), ciprofloxacine (33.6%) et ofloxacine (41.4%).
- La colistine (24.3%) et le triméthoprim/sulfaméthoxazole (60%).

L'étude des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des entérobactéries étudiées montre une nette dominance des souches productrices de BLSE (37.1%). Parmi ces dernières 20 souches (14.3%) produisent également une céphalosporinase (CASE). L'hyperproduction de céphalosporinase comme seul mécanisme de résistance est observée chez 6 souches (4.3%), la production de pénicillinases est observée chez 25% des souches et le phénotype sauvage est détecté chez 33.6% des souches.

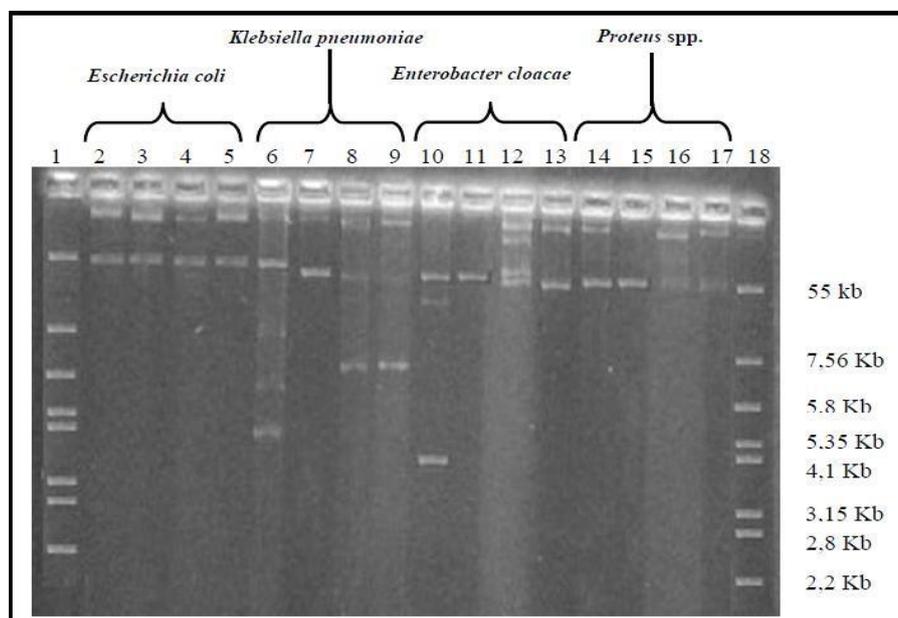
Contre les souches produisant une BLSE ou une BLSE +CASE, l'amikacine et la colistine sont les molécules les plus actives (**Tableau 4**).

**Tableau4.** Nombre de souches résistantes (%) aux autres classes d'antibiotiques en fonction des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

Phénotypes \ Antibiotiques	Antibiotiques									
	TM	GM	AN	K	NA	OFX	CIP	CS	SXT	N (%)
<b>BLSE</b>	30 (93,7)	31 (96,8)	2 (6,2)	15 (65,2)	23 (71,8)	21 (65,6)	17 (53,1)	6 (18,7)	30 (93,7)	32 (22,8)
<b>BLSE+CASE</b>	19 (95)	18 (90)	3 (15)	7 (63,6)	13 (65)	12 (60)	12 (60)	2 (10)	18 (90)	20 (14,3)
<b>CASE</b>	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	3 (50)	3 (50)	3 (50)	2 (33,3)	6 (4,3)
<b>PASE</b>	6 (17,1)	4 (11,4)	0 (0)	11 (42,3)	19 (54,3)	17 (48,6)	11 (31,4)	9 (25,7)	29 (82,8)	35 (25)
<b>Sauvage</b>	3 (6,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (14,9)	5 (10,6)	4 (8,5)	14 (29,8)	5 (10,6)	47 (33,6)

BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre élargi ; CASE : céphalosporinase ; PASE : pénicillinase ; TM : tobramycine ; GM : gentamycine ; AN : amikacine ; K : kanamycine ; NA : acide nalidixique ; OFX : ofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; SXT : triméthopime/sulfaméthoxazole n : nombre total de souches isolées

Sur 29 souches qui ont fait l'objet de la conjugaison bactériennes, 18 ont transféré les gènes de résistances aux antibiotiques. L'analyse du contenu plasmidique des souches testées ainsi que de leurs transconjugants, montre que la majorité des souches contiennent 1 à 2 plasmides de taille supérieure à 55kb (**figure16**).



**Figure16.** Profils plasmidiques des 4 espèces d'entérobactéries et de leurs transconjugants

(1: V.517); (2: S.E.2 ); (3: Tc.E.2 ); (4: S.E.47); (5: Tc.E.47); (6: S.Kp.18); (7: Tc.Kp.18); (8: S.Kp.21); (9: Tc.Kp.21); (10: S.Ec.12); (11: Tc.Ec.12); (12: S.Ec.14 ); (13: Tc.Ec.14); (14: S.Pm.2); (15: Tc.Pm.2); (16: S.Pm.3); (17: Tc.Pm.3 ); (18: V.517)

### Article 2. Résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées au CHU de Tlemcen (Algérie)

Auteurs : A. Ayad, M. DRISSI

Au CHU de Tlemcen entre Octobre 2008 et avril 2009, 112 entérobactéries sont collectées, ce qui correspond à une fréquence d'isolement de 43.6% (112 souches/ 257prélèvements). 107 souches sont isolées a partir de patients et 5 a partir de l'environnement (matelas et respirateurs)

L'identification des espèces montre une prédominance d'*Escherichia coli* (40.2%) suivie de *Klebsiella pneumoniae* (39.3%) et d'*Enterobacter cloacae* (12.5%). Viennent ensuite les autres entérobactéries avec 9 isolats (8%), dont 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Citrobacter koseri*, 1 *Citrobacter freundii*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Escherichia fergusonii*, 1 *Pantoea spp* et 1 *Serratia marcescens*.

Les résultats de l'antibiogramme révèlent une très bonne activité de l'imipénème, la colistine et l'amikacine avec respectivement 100%, 94.6% et 93.7% de bactéries sensibles. Pour les autres antibiotiques, les taux de résistance sont les suivants :

- Les β-lactamines : ampicilline (95.5%), ampicilline + sulbactam (80.4%), amoxicilline (98.2%), amoxicilline + acide clavulanique (83.9%), ticarcilline (89.3%), ticarcilline + acide clavulanique (70.5%), pipéracilline (79.5%), pipéracilline + tazobactam (28.6%), mezlocilline (82.1%), céfalotine (85.7%), céfoxitine(25.9%), ceftriaxone et céfotaxime (72.3%), ceftazidime (75%), aztréonam (68.8%).
- Les Aminosides: gentamicine et tobramycine (66.1%),
- Les quinolones: acide nalidixique (75%) ciprofloxacine (59.8%)
- Le trimétho-prime/sulfaméthoxazole (67%).

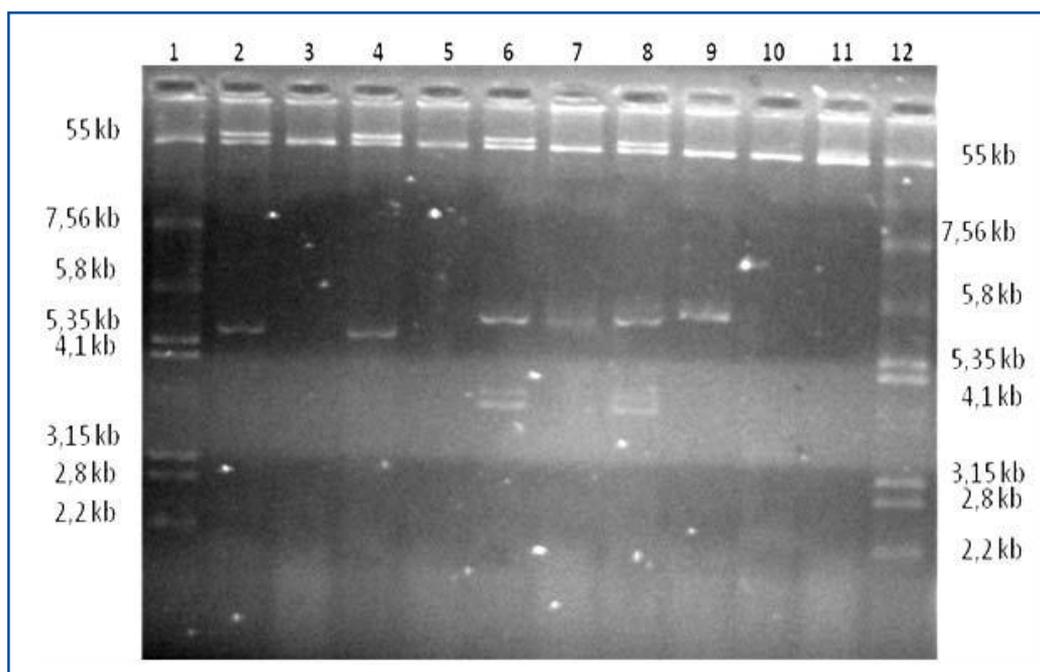
L'analyse des phénotypes de résistance aux β- lactamines des entérobactéries étudiées montre une nette dominance des souches productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE) (66.9%), avec 38 souches de *K. pneumoniae*, 29 souches d'*E. coli*, 5 souches d'*E. cloacae*, 2 souches de *Citrobacter koseri* et 1 souche de *Citrobacter freundii*. Parmi les entérobactéries présentant ce phénotype, 12 souches (10.7%), dont 6 *K. pneumoniae*, 4 *E. coli* et 2 *E. cloacae*, produisent également une céphalosporinase constitutive. L'hyperproduction de céphalosporinases comme seul mécanisme de résistance est observée seulement chez 6 souches (5.4%). La production de pénicillinases est exclusivement observée chez 12 souches (10.7%) du genre *Escherichia* (11 *Escherichia coli* et 1 *Escherichia fergusonii*). Enfin, un total de 19 souches, soit 17% d'entérobactéries, dont 4 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes* et 1 *Serratia spp*, n'ont présenté aucune résistance acquise et sont considérées comme des souches sauvages.

Il est à noter que toutes les souches isolées de l'environnement sont des souches multirésistantes présentant des phénotypes BLSE ou BLSE+CASE.

Sur quarante trois (43) souches qui ont fait l'objet de la conjugaison bactériennes, 23 ont transféré leurs gènes de résistance aux Antibiotiques. L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants obtenus par la méthode de diffusion en milieu solide, montre le transfert de phénotype BLSE associé à la résistance aux aminosides chez l'ensemble de souches testées. Par contre, le transfert de la résistance aux quinolones et au triméthoprim/sulfaméthoxazole n'est observé que chez quelques isolats.

Parmi les souches qui présentent le phénotype BLSE + céphalosporinase, la nature plasmidique de céphalosporinases n'est détectée que chez trois souches: 1 *Kiebsiella pneumoniae* et 2 *Entérobacter cloacae*.

L'analyse du contenu plasmidique des souches entérobactéries et de leurs transconjugants ayant reçu le phénotype BLSE associé à la résistance aux autres classes d'antibiotiques, montre la présence d'un plasmide de taille supérieure à 55 Kb chez l'ensemble des souches étudiées (**Figure 17**).



(1 : V517) ; (2 : E61) ; (3 : Tc E61) ; (4: E62) ; (5 : Tc E62) ; (6 : E64) ; (7 : Tc E64) ; (8 : E69) ; (9 : Tc E69) ; (10 : E74) ; (11 : Tc E74) ;  
(12: V517).

**Figure17. Profils plasmidiques des souches d'entérobactéries et de leurs transconjugants**

### Article 3. Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010)

Auteurs : Zaket Baba Ahmed-Kazi Tani, Dominique Decre, Nathalie Genel, Zahia Boucherit-Otmani, Guillaume Arlet, and Mourad Drissi

Soixante et onze (71) souches cliniques non redondantes d'entérobactéries (17 *Escherichia coli*, 50 *Klebsiella pneumoniae* et 4 *Enterobacter cloacae*), isolées au niveau de CHU de Tlemcen entre Avril 2008 et mars 2010 et définies sur la base de leur phénotype de résistance comme productrices de BLSE, ont fait l'objet de cette étude.

L'ensemble de ces souches présentent de hauts niveaux de résistance à la ticarcilline (CMI > 512 µg/ml) et la pipéracilline (CMI = 512 µg/ml). Les CMI du céfotaxime varient de 64 à > 512 µg/ml, céftazidime de (8 à 128 µg/ml), gentamicine de (32 à > 512 µg/ml) et ceux de la tobramycine (8 à > 512 µg/ml). Toutes les souches sont sensibles à l'imipénème (CMI 0.125 à 0.25 µg/ml). Pour les autres classes d'antibiotiques, 64 souches sont résistantes à la ciprofloxacine (8 à 64 µg/ml) et 57 au triméthoprime-Sulfaméthoxazole (diamètre = 7mm).

L'étude épidémiologique montre 25 profils rep-PCR différents parmi les 71 entérobactéries étudiées : 11 clones différents parmi les 17 souches d'*E.coli*, 12 clones parmi les 50 souches de *K. pneumoniae* et 2 clones parmi les 4 souches d'*E. cloacae* étudiées.

Chaque clone d'*E.coli* contient 1 à 4 souches. L'analyse phylogénétique montre que 4 clones appartiennent au groupe phylogénétique A1, 3 au groupe phylogénétique B2 (1 B2-2 et 2 B2-3) et 4 au groupe phylogénétique D1. Seul 1 clone d'*E.coli* B2-3 appartient à la séquence type ST131.

Deux clones majeurs parmi les isolats de *K. pneumoniae* sont identifiés et désignés CKp1 (11 isolats 22%) et CKp5 (25 isolats 50%). Les souches du clone CKp1 sont isolées uniquement en 2008 dans le service de réanimation, alors que celles du clone CKp5 étaient prédominantes en 2009 et sont isolées aussi bien dans le service de réanimation que dans les services de chirurgie.

Les clones CKp1 et CKp5 sont identifiés par MLST. Ils correspondent respectivement aux séquences types ST931 (clone CKp1) et ST15 (clone CKp5).

Les gènes codant l'enzyme CTX-M sont détectés chez tous les isolats et leurs transconjugants (**tableau 5**). Les séquences des acides aminés déduites correspondent au CTX.M-15 chez 69 isolats (97%) (16 *E. coli*, 50 *K. pneumoniae* et 3 *E. cloacae*) et CTX.M-3 chez 2 (3%) isolats (*E. coli* et *E. cloacae*). Le gène *bla*<sub>TEM-1</sub> est identifié chez 7 *E.coli*, 33 *K. pneumonie* et 4 *E.cloacae*. Le gène

*bla<sub>OXA-1</sub>* est détecté chez 44 isolats (8 *E. coli*, 33 *K pneumoniae* et 3 *E. cloacae*). Parmi les 69 souches *bla<sub>CTX-M-15</sub>* positif, 39 (55%) portent les 2 gènes *bla<sub>TEM-1</sub>* et *bla<sub>OXA-1</sub>*. Aucune des souches étudiées n'exprime la carbapénémase de classe D, OXA-48.

Les gènes codant les enzymes modifiant les aminosides (*aac(3')-II*) et (*aac(6')-Ib-cr*) sont trouvés chez 43 (60%) isolats. Leur production simultanée est rapportée chez 41 (58%) souches.

En ce qui concerne la résistance aux quinolones, le gène *qnrB2* est trouvé chez 7 (10%) souches qui expriment également le gène *aac(6')-Ib-cr*.

Concernant la résistance aux sulfamides, 50 souches contiennent le gène *sul2*, 22 le gène *sul1* et 15 contiennent les deux gènes *sul1* et *sul2*. Les combinaisons des gènes cassettes, conférant la résistance au triméthoprim, identifiées chez 22 souches sont les suivantes : *dfrA1-aadA2* chez 2 souches, *dfrA12-aadA2* chez 17 souches et *aadA2* seul chez 3 souches.

Les expériences de conjugaison réalisées sur 25 souches BLSE montrent le transfert des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* chez 18 souches (8 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae* et 2 *E. cloacae*). Neuf transconjugants sont résistants également aux aminosides (gentamicine et tobramycine), 5 au ciprofloxacine et 6 au triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Le typage des plasmides montre que dix souches appartiennent au groupe d'incompatibilité IncL/M.

**Tableau5.** Distribution des gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et des déterminants de résistance associées chez les entérobactéries isolées au CHU de Tlemcen (Avril 2008 – Mars 2010)

Clone (n souches)	CTX-M allele	Groupe Phylogénique	Sequence		date	gènes de resistance Associée							Genes cassettes des integron classe1			
			type	d'isolement		services	bla <sub>TEM-1</sub>	bla <sub>OXA-1</sub>	aac(3 $\phi$ )-II	aac(6 $\phi$ )-Ib-cr	qnrB2	sul1	sul2	dfrA1	dfrA12	aadA2
CE1 (4)	15	A1			10/08-12/08	Réa-Chirurgie	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
CE2 (1)	15	B2-2			11/08	Réa	+	-	+	-	-	-	+			
CE3 (2)	15	D1			01/09-02/09	Réa	+	+	-	-	-	-	+			
CE4 (1)	15	D1			02/09	Chirurgie	-	-	+	-	-	-	-			
CE5 (1)	15	D1			03/09	Réa	-	-	-	-	+	+	-	+		+
CE6 (2)	15	A1			03/09	Réa	-	-	-	-	-	-	-			
CE7 (2)	15	B2-3			04/09-07/09	Réa-Chirurgie	+	-	-	-	+	-	+	-		+
CE8 (1)	15	B2-3	ST131		04/09	Chirurgie	+	+	+	+	-	-	+			
CE9 (1)	3	A1			04/09	Réa	-	-	-	-	-	-	-			
CE10 (1)	15	A1			07/09	Chirurgie	-	+	+	+	-	-	+			
CE11 (1)	15	D1			02/10	Chirurgie	+	-	-	-	-	-	-			
CKp1 (11)	15		ST931		04/08-05/08	Réa	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
CKp2 (1)	15				04/08	Réa	-	-	-	-	-	-	+			
CKp3 (1)	15				04/08	Réa	-	-	-	-	-	+	-		+	+
CKp4 (3)	15				10/08-11/08	Réa	+	+	+	+	-	-	+			
CKp5 (25)	15		ST15		10/08-03/10	Réa-Chirurgie	+	+	+	+	-	-	+			
CKp6 (1)	15				10/08	-Chirurgie	-	-	-	-	-	-	-			
CKp7 (2)	15				03/09-04/09	Chirurgie	+	+	-	+	+	-	-			
CKp8 (1)	15				03/09	Chirurgie	-	-	-	-	-	-	-			
CKp9 (1)	15				02/10	Réa	+	+	+	+	+	-	-			
CKp10 (1)	15				02/10	Réa	-	-	-	-	-	-	-			
CKp11 (2)	15				02/10-03/10	Réa	+	+	+	+	-	-	-			
CKp12 (1)	15				03/10	Réa	-	-	+	+	+	-	-			
CEc1 (1)	3				04/08	Réa	+	-	-	-	-	-	+			
CEc2 (3)	15				11/08-01/09	Réa	+	+	+	+	+	+	+			

E, *Escherichia coli*; K, *Klebsiella pneumoniae*; Ec, *Enterobacter cloacae*.

### Article 4. Typage moléculaire et caractérisation des $\beta$ -lactamases de types TEM, SHV, CTX-M et CMY-2 chez des souches *d'Enterobacter cloacae* isolées chez des patients et leur environnement hospitalier dans l'ouest algérien

Auteurs : D. Souana, A.S. Amir, S.N. Bekhoucha, M. Berrazeg, M. Drissi

Quarante-deux souches cliniques non redondantes *d'Enterobacter cloacae*, isolés au niveau de trois CHU dans l'ouest algérien (Tlemcen, Sidi- Bel- Abbes, Oran) entre 2009 et 2011 et définies sur la base de leur phénotype de résistance comme productrices de BLSE, ont fait l'objet de cette étude.

Les souches étudiées sont isolées de patient et de leur environnement (12 à Tlemcen, 15 à Sidi-Bel-Abbès et 15 à Oran). Elles sont trouvées fréquemment dans l'unité de soins intensifs (66,66%). Quatorze souches sont isolées à partir des aspirations trachéales (33,33%), 13 à partir des sondes urinaires (30,95%), 6 à partir des plaies (14,28%) et 9 à partir de l'environnement hospitalier (21,42%).

Les résultats de l'antibiogramme et de CMI montrent une très bonne activité de la colistine, l'amikacin et l'imipénèm avec 100% ; 97,6% et 88,1% de souches sensibles respectivement. Cependant, la majorité des souches étudiées résistent à l'ensemble des autres antibiotiques testés (>64%).

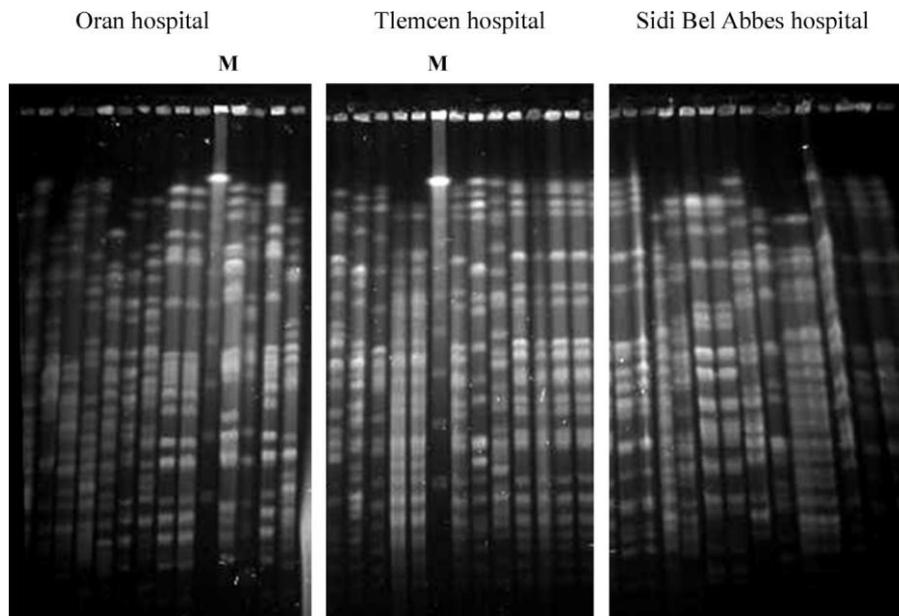
Le teste à la cloxacilline montre que 15 isolats parmi les 42 souches productrices de BLSE testées produisent également une céphalosporinase.

Parmi les souches étudiées 32 ont fait l'objet des expériences de PCR et de séquençage. Vingt-sept souches portent les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>*, 3 souches portent les gènes *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>* et 2 souches portent les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* et *bla<sub>SHV</sub>*. Parmi les BLSE identifiées dans cette étude les CTX-M-15 et les CTX-M-3 sont détectées chez 69% des souches (y compris les 12 souches isolées au CHU de Tlemcen), et *bla<sub>SHV-12</sub>* chez 5 souches isolées au CHU d'Oran et de Sidi-Bel-Abbes. De plus une céphalosporinase plasmidique *bla<sub>CMY-2</sub>* est détectée chez une souche *d'Enterobacter cloacae* isolées au CHU d'Oran.

Parmi les 42 souches étudiées 21 pulsotypes différents (A-U) sont déterminés selon les critères de Tenover (**figure 18**)

L'analyse des plasmides montre que les souches testées contiennent de 1 à 5 différents plasmides de poids moléculaire compris entre 140b et 140kb. Les PCR réalisés sur les transconjugants permettent de mettre en évidence le transfert des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>CMY-2</sub>* chez 6, 7 et 1

souche respectivement. Ces transconjugants sont également résistants aux aminosides et aux triméthoprine/sulfaméthoxazole



**Figure 18. L'analyse de la XbaI-digestion de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé**

### Article 5. Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals

Auteurs : Amel Ayad, Mourad Drissi, Claire de Curraize, Chloé Dupont, Alain Hartmann, Sébastien Solanas, Eliane Siebor, Lucie Amoureux and Catherine Neuwirth

Deux cent trente neuf souches d'*E coli* sont isolées entre octobre 2008 et janvier 2012 au niveau des trois CHU du Nord-Ouest Algérien (Tlemcen, Sidi bel Abbes et Oran). Deux cent trente sept sont isolées des patients admis dans les unités des soins intensif et les services de chirurgie et neurochirurgie et 2 souches sont collectées à partir de l'environnement hospitalier.

Soixante sept isolats producteurs de BLSE sont identifiés : 35 au CHU de Tlemcen, 13 au CHU de Sidi bel Abbes et 19 au CHU d'Oran. Ces souches sont fréquemment collectées au niveau des unités des soins intensif (58,2%) et des services de chirurgie (26,9%). 18 souches sont trouvées dans les plaies (26,9%), 17 dans les aspirations trachéales (25,4%), 17 dans les urines et les sondes urinaires (25,4%), 7 dans les prélèvements rectaux (10,4%), 4 dans les escarres (6%), 1 dans les cathéters (1,5%), 1 dans un tube gastrique (1,5%) et 2 dans l'environnement hospitalier (3%). Parmi ces souches soixante quatre isolats portent les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> (52 *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, 5 *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, 5 *bla*<sub>CTX-M-1</sub> et 2 *bla*<sub>CTX-M-14</sub>), tandis que 2 souches portent le gène *bla*<sub>SHV-12</sub> et une souche le gène *bla*<sub>TEM-167</sub>.

Les résultats de l'antibiogramme des souches BLSE, montrent une très bonne activité de l'imipénème, l'értapénème et la colistine avec 100% de souches sensibles et une bonne activité de pipéracilline-tazobactame, céfoxitine et amikacine avec respectivement 76%, 64,2% et 80,6% de souches sensibles. Cependant, la majorité de souches étudiées résistent à l'ensemble des autres antibiotiques testés (>53%) (**Tableau 6**)

Parmi les souches étudiées, 12 sont résistantes à l'ensemble des aminosides testés dont 4 portent le gène *armA* et 8 le gène *rmtB*, gènes codants les méthylases de l'ARNr 16S. *armA* est détecté parmi les isolats produisant les BLSE de type CTX-M-15, CTX-M-1 et TEM-167, tandis que *rmtB* est identifié uniquement chez les souches produisant CTX-M-15 (**Tableau 7**). Les 8 souches RmtB positives proviennent toutes de CHU de Tlemcen et appartiennent au pulsotype A et à la séquence type ST 405. Cependant, une large diversité est observée parmi les souches productrices de ArmA qui appartiennent à trois différents pulsotypes (B, C et D) et à trois séquences types différentes : ST10 (1 isolat de CHU de Sidi Bel Abbes), ST167 (1 isolat de CHU de Tlemcen) et ST117 (deux isolats de CHU d'Oran).

Chez les 8 souches *rmtB* positives, ce gène est localisé sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncFIA. Le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* est localisé sur le même plasmide Chez 4 isolats et sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncII chez les autres isolats. Le plasmide IncFIA est transféré uniquement en présence du plasmide IncII. Le gène *armA* est localisé avec le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* sur un plasmide transférable du groupe d'incompatibilité IncL/M chez deux souches isolées aux CHUs de Tlemcen et de Sidi Bel Abbe ; et sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncFIA chez les deux autres souches isolées au CHU d'Oran (pour ces deux isolats les gènes codant les BLSE, CTX-M-1 et TEM-167, sont localisés sur un plasmide IncN).

**Tableau 6.** Résistance aux Antibiotiques d'*Escherichia coli* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu isolées des trois hôpitaux de l'ouest Algérie.

Antibiotiques	Taux de résistance			
	Tlemcen (n = 35)	Sidi bel Abbes (n = 13)	Oran (n=19)	Totale (n=67)
Amoxicilline	100	100	100	100
Amoxicilline-acide clavulanique	82.8	92.3	42.1	73.1
Ticarcilline	100	100	100	100
Ticarcilline-acide clavulanique	97.1	100	89.5	95.5
Pipéracilline	100	100	100	100
Pipéracilline-tazobactame	40	15.4	0	23.9
Ertapénème	0	0	0	0
Imipénème	0	0	0	0
Céfoxitine	40	38.5	26.3	35.8
Céfotaxime	100	100	94.7	98.5
Ceftazidime	91.4	92.3	84.2	89.5
Céfepéme	100	92.3	89.5	95.5
Aztreoname	100	100	100	100
Kanamicine	60	46.1	57.9	56.7
Gentamicine	77.1	76.9	63.2	73.1
Tobramycine	77.1	76.9	63.2	73.1
Amikacine	25.71	7.7	15.8	19.4
Nétilmicin	48.6	61.5	57.9	53.7
Acide nalidixique	68.6	53.8	89.5	71.6
Ofloxacine	68.6	61.5	89.5	73.1
Ciprofloxacine	68.6	61.5	84.2	71.6
Colistin	0	0	0	0
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	80	84.6	57.9	74.6

**Tableau 7.** Caractéristiques des souches d *E. coli* productrices d'ARNr méthylase 16S isolées dans les hôpitaux de Tlemcen, Sidi Bel Abbés et Oran, Algérie.

Souche	Hôpital	salle	Date d'isolement	Goûter	BLSE (plasmide)	ARNr méthylase 16S (Plasmide)	Pulsotypes PFGE	MLST
T E62	Tlemcen	Neurochirurgie	19/10/2008	Escarre	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc L/M 55ko (T+) <sup>3</sup> ]	<i>armA</i> [même Inc L/M55 ko (T+)]	C	ST 167(CC ST10)
S E23	Sidi Bel Abbés	Neurochirurgie	18/03/2010	Pus	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc L/M 55 ko (T+)]	<i>armA</i> [même Inc L/M55 ko (T+)]	D	ST 10(CC ST10)
0 E11	Oran	USI <sup>1</sup>	16/12/2010	Plaie infectée	<i>bla</i> <sub>TEM-167</sub> [Inc N 40 ko(T+)]	<i>armA</i> [Inc taille FIA nd(T+)] <sup>5</sup>	B	ST 117
0 E13	Oran	Neurochirurgie	16/12/2010	Sonde Gastrique	<i>bla</i> <sub>CTXM-1</sub> [Inc N 40 ko(T+)]	<i>armA</i> [Inc taille FIA nd(T-)]	B	ST 117
T E114	Tlemcen	USI	01/04/2010	Aspiration trachéale	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc FIA Environ 100 ko (T-) <sup>4</sup> ]	<i>rmtB</i> [Inc FIA Environ 100 ko (T-)]	A	ST 405
T E116	Tlemcen	USI	02/05/2010	Écouvillon rectal	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc II Environ 100 ko (T+)]	<i>rmtB</i> [Inc FIA Environ85 ko(T+)]	A	ST 405
T E118	Tlemcen	USI	01/06/2010	Aspiration trachéale	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [(Inc II Environ 100 ko (T+)]	<i>rmtB</i> [Inc FIA Environ85 ko (T+)]	A	ST 405

T E120	Tlemcen	USI	01/06/2011	Aspiration trachéale	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc FIA Environ 100 ko (T+)]	<i>rmtB</i> [Inc FIA Environ 85 ko (T+)]	A	ST 405
T E124	Tlemcen	USI	27/02/2011	Écouvillon rectal	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc FIA Environ 100 ko (T-)]	<i>rmtB</i> [même Inc FIA Environ 100 (T-)]	A	ST 405
T E133	Tlemcen	ORL <sup>2</sup>	21/04/2011	Cathéter	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc FIA Environ 100 ko (T-)]	<i>rmtB</i> [même Inc FIA Environ 100 ko (T-)]	A	ST 405
T E134	Tlemcen	USI	26/04/2011	Urine	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> [Inc FIA Environ 100ko (T-)]	<i>rmtB</i> [même Inc FIA Environ 100 ko (T-)]	A	ST 405

**Article 6 (Lettre à l'éditeur). First Detected Human Case in Algeria of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate.**

Auteurs : Meryem Berrazeg, Linda Hadjadj, Amel Ayad, Mourad Drissi, Jean-Marc Rolaina

Six souches d'*E. coli* résistantes à la colistine (CMI > 2 µg/ml), collectées entre Octobre 2009 et Décembre 2011 de CHU de Sidi bel Abbes, ont fait l'objet d'une PCR pour rechercher le gène *mcr-1*, gène conférant la résistance à cet antibiotique. Ce gène est détecté chez un isolat (SE65) trouvé dans les urines d'un homme polytraumatisé de 18 ans hospitalisé en Mai 2011 sans antécédents de voyage à l'étranger.

Les caractéristiques de la souches SE65 hébergeant le gène *mcr-1* sont présentées dans le tableau 8. Cette souche appartient à la séquence type ST405.

Le gène *mcr-1*, détecté pour la première fois en Algérie dans cette étude, est transféré avec succès à la souche réceptrice *E. coli* J53 (F<sup>-</sup> *met pro Azi<sup>r</sup>*) par conjugaison, ce qui suggère qu'il est localisé sur un plasmide transférable.

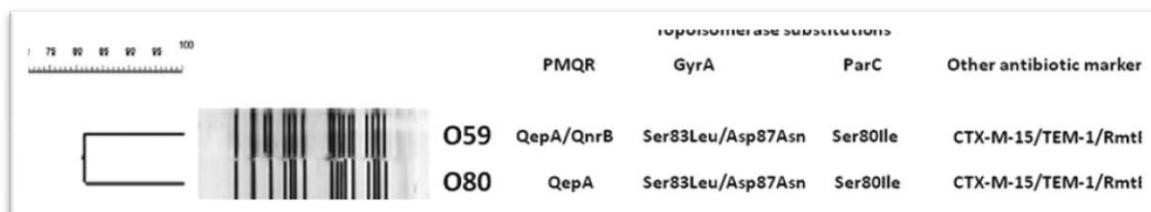
**Tableau8.** Caractéristiques des souches d'*E.coli mcr-1*-positives et d'un *E. coli* transconjugant par test de sensibilité aux antibiotiques.

Antibiotiques	Diam de zone d'inhibition (mm) de la souches indiquée (gène[s] résistance MIC [µg/ml] ) de la colistine		
	<i>E. coli</i> SE65 ( <i>mcr-1 bla</i> <sub>CTX-M15</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1; 4</sub> )	Transconjugants ( <i>mcr-1; 4</i> )	<i>E. coli</i> J53 (none; 0.125)
Amoxicilline	6	6	27
Amoxicilline-clavulanique	6	9	20
Ticarcilline-clavulanique	6	11	25
Céfotaxime	6	28	28
Ceftriaxone	6	27	27
Céfepéme	6	28	28
Aztreoname	9	31	31
Imipénème	31	27	27
Ertapénème	22	30	30
Gentamicine	23	25	25
Amikacine	22	28	27
Ciprofloxacine	6	26	32
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	6	6	20
Rifampine10		9	10
Fosfomycine	31	31	17
Colistine	15	16	19

**Article 7. Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance *qepA1* Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Algeria**

Auteurs :Betitera Yanat, Radia Dali Yahia, Leila Yazı, Jesu’s Machuca, Paula Di’az-De-Alba Abdelaziz Touati, A’lvaro Pascual, et Jose’-Manuel Rodri’guez-Marti’nez

Parmi les 49 isolats cliniques d’*E. coli* analysés, 20 (41%) sont positifs pour au moins un gène PMQR (plasmid mediated quinolone resistance) : *qnrS1* (n = 1 souche), *aac(6’)Ib-cr* (n = 16), *aac(6’)Ib-cr + qnrB1* (n = 1), *qepA1* (n = 1), et *qepA1 + qnrB1* (n = 1). Cette étude rapporte pour la première fois l’émergence de gène *qepA* en Algérie. Elle se concentre sur deux isolats d’*E. coli qepA1*-positifs O59 et O80, collectées des urines de deux femmes âgées de 48 et 60 ans hospitalisées respectivement dans les services de néphrologie et de soins intensifs chirurgicale. Ces souches multirésistantes hébergent les gènes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *rmtB* (Figure 19). Elles sont résistantes à la céfoxitine même en présence de cloxacilline et n’expriment aucune céphalosporinase plasmidique, ce qui suggère la production d’une céphalosporinase chromosomique.



**Figure 19 : Dendrogramme des motifs générés par électrophorèse sur gel en champ pulsé d’isolats d’*Escherichia coli qepA*-positifs. PMQR, résistance aux quinolones à médiation plasmidique.**

Les séquences QRDR des gènes *gyrA* et *parC* montrent que les isolats d’*E. coli qepA* positifs portent deux mutations dans *GyrA* (Ser83Ile et Asp87Asn) et une mutation dans *ParC* (Ser Ile80), avec une CMI élevée de ciprofloxacine (> 256 mg/L).

Les résultats de PFGE révèlent une forte similitude génotypique (89%) entre les souches d’*E.coli qepA*-positifs montrant une parenté clonale.L’étude de l’environnement génétique de gène *qepA1* montre qu’il est flanqué des séquences d’insertions IS26 et ISCR3

## 2. Discussion

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie et à travers le monde. Ainsi, plusieurs publications ont rapporté l'augmentation des taux de résistance et la détection de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dans notre pays. De ce fait, dans cette étude on analysé sept articles (**Annexe**) portant sur la résistance des entérobactéries aux antibiotiques dans l'Ouest Algérien.

Pour les entérobactéries étudiées, les résultats révèlent qu'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont les espèces les plus dominantes, avec des taux d'isolement de 37.1% et 21.4% respectivement dans l'article 1 (**Souna et al., 2011**) et 40.2% et 39.3% respectivement dans l'article 2 (**Ayad et al., 2012**), ce qui concorde bien avec ceux obtenus en Tunisie (**Messai et al., 2007**), au Maroc (**Sekhsokh et al., 2008**) et en France (**Gardien et al., 1997**).

La présente étude souligne le caractère inquiétant de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien. Des taux de résistance élevés à la plupart des antibiotiques testés sont rapportés et semblent être plus importants que ceux rapportés par le réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Rahal et al., 2012 ; 2015**)

Il est à noter que, dans la majorité des articles analysés, le phénomène marquant chez les souches étudiées est leur résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G). Les fréquences des souches résistance aux C3G sont très supérieurs à ceux rapportés dans différents pays (**Borg, et al., 2008; Trystram et al., 2013**). L'évolution de cette résistance est liée à l'émergence et la diffusion de plusieurs mécanismes, dont l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomiques, les céphalosporinase plasmidiques mais le plus important étant la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), **(37.1%) en Article 1, (67%) en Article 2 et (35%) en Article 4**.

Cette étude montre également que ces souches BLSE sont retrouvées dans plusieurs services, mais avec un taux d'isolement plus important dans les unités de soins intensifs, ce qui est certainement lié à l'utilisation massive des C3G dans ces services. En effet, la prévalence des phénotypes de résistance constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription des antibiotiques (**Bertrand et al., 2003**).

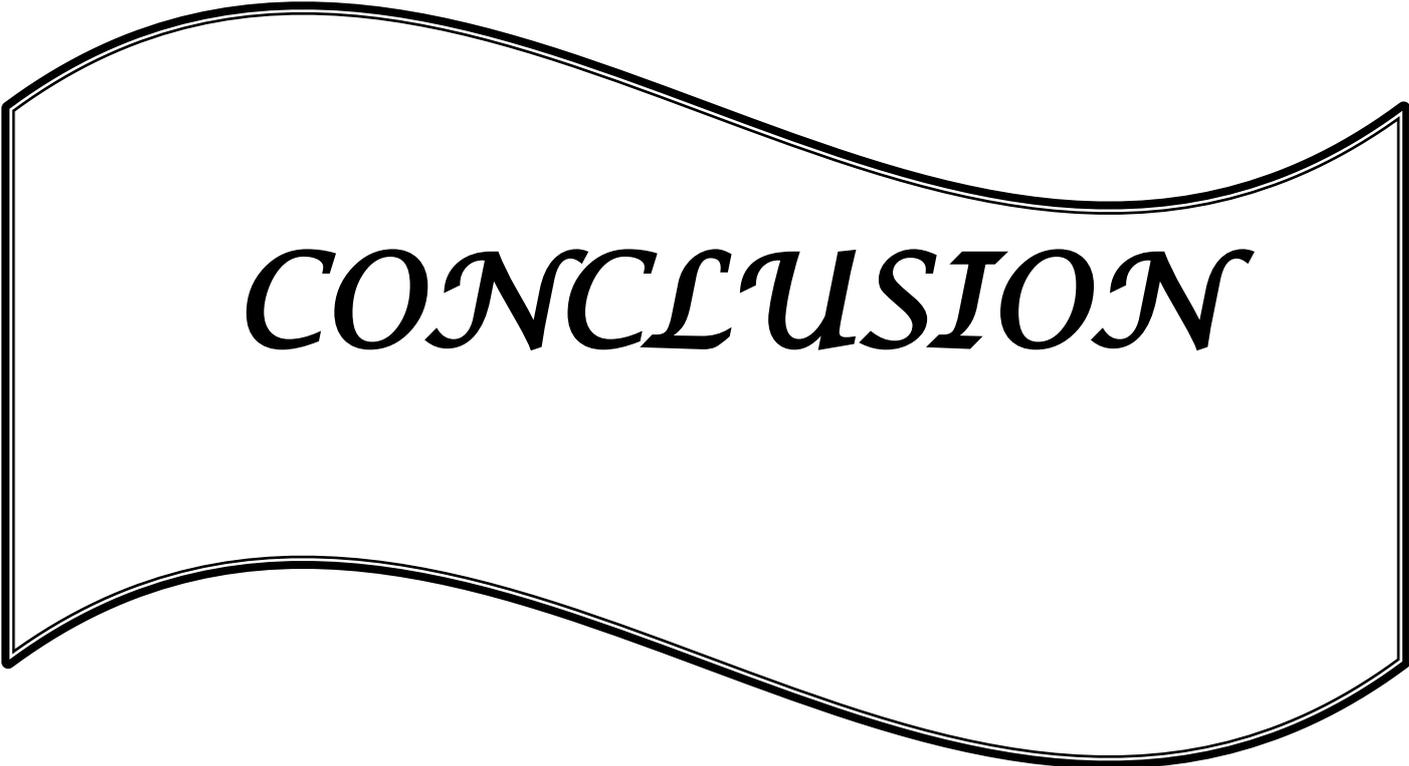
L'épidémiologie des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries, est en perpétuelle évolution en Algérie. En effet, une grande diversité de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines a été constatée avec émergence de nouveaux gènes, *bla<sub>TEM-167</sub>* et *bla<sub>CMY-16</sub>* chez les

souches d'*E.coli* dans l'article 5 (Ayad *et al.*, 2016) et *bla*<sub>CMY-2</sub> rapporté pour la première fois chez des souches *Enterobacter cloacae* en Algérie dans l'article 4 (Souana *et al.*, 2014). De plus la dominance de gène codant la BLSE CTX-M15, est décrite dans l'ensemble des articles analysés confirmant la grande diffusion de cette enzyme à l'échelle mondial (Woodford *et al.*, 2004 ; Lahlaoui *et al.*, 2014).

plusieurs gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB* pour la première fois en Algérie, *aac* (3')-II, *aac*(6')-Ib, *aadA* et *aadB*), aux quinolones (*qepA1*, *qepA3* et *oqxAB* pour la première fois en Algérie, *aac*(6')-Ib-cr, *qnr*(A, B, S, C, D) au triméthoprime/Sulfaméthoxazole (*dfr* et *sul*) et à la colistine (*mcr-1* pour la première fois en Algérie) ont été également décrits dans les articles étudiés.

Dans les articles analysés, les gènes codant les BLSE sont généralement portées par de grands plasmides avec des gènes de résistance aux autres classes d'antibiotiques. Leur association à d'autres déterminants de résistance, essentiellement aux aminosides et aux quinolones, concourt à une co-sélection de la résistance aux  $\beta$ -lactamines par ces derniers antibiotiques largement utilisés en thérapeutique humaine. Par ailleurs, ces souches ont présenté une sensibilité totale à l'imipénème et des faibles taux de résistance vis-à-vis de l'amikacine et de la colistine, Ce qui augmente le choix des associations d'antibiotiques, associations indispensables pour le traitement des infections nosocomiales sévères (Davis *et al.*, 2010).

La multi résistance des souches, non reliées génétiquement, rapportée dans cette étude, serait due à la diffusion horizontale du matériel génétique. En effet, les conjugaisons bactériennes ont montré le transfert de plusieurs gènes de résistance : *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-167</sub>, *bla*<sub>CMY-16</sub>, *armA*, *rmtB* et *mcr-1*. L'analyse des plasmides, des souches et leurs transconjugants, a révélé l'implication de plusieurs plasmides de différents groupes d'incompatibilités comme support de ces gènes, avec prédominance des plasmides du groupe d'incompatibilité IncF, en particulier le réplicon IncFIA. IncF représente le groupe de plasmides les plus fréquemment associés à la dissémination des CTX-M ainsi que d'autres gènes de résistance aux quinolones et aux aminosides (Marcadé *et al.*, 2009 ; Carattoli, 2009 ; Mnif *et al.*, 2013).



***CONCLUSION***

Dans cette étude 7 articles ont été analysés. Ces articles reportent des données phénotypiques et moléculaires sur des souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques, isolées de trois grands CHU de l'ouest algérien (CHU de Tlemcen, CHU de Sidi Bel Abbes et CHU d'Oran).

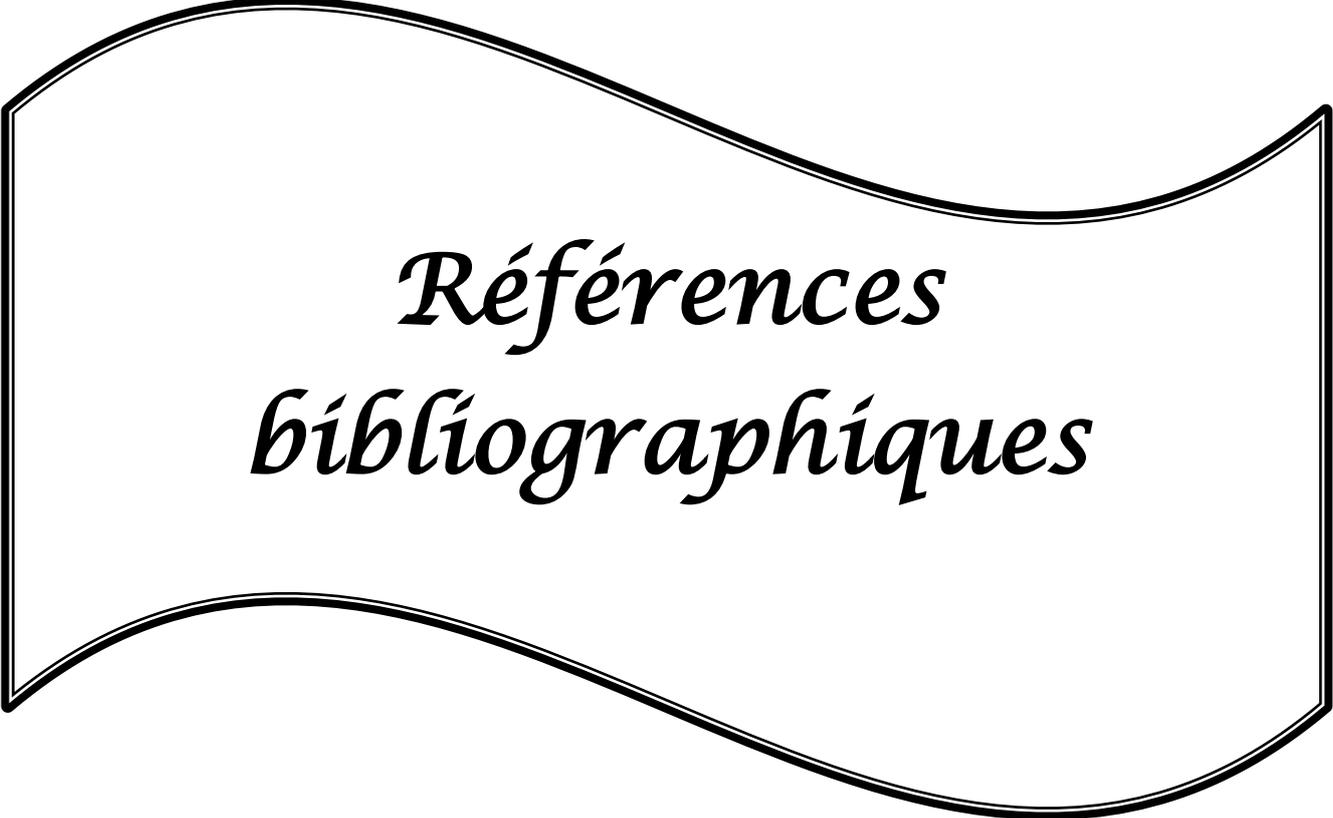
La synthèse bibliographique, portant sur l'actualité de la résistance aux antibiotiques à l'échelle nationale, un grand nombre de ces souches ont présenté des phénotypes de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones, la colistine et le triméthoprim/sulfaméthoxazole.

La majorité des antibiotiques testés  $\beta$ -lactamines, quinolones, aminoglycosides et l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole ont perdu leur place dans le traitement des infections aux entérobactéries. Les niveaux de résistance atteints vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines sont associés à de nombreux mécanismes de résistance, avec prédominance de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), Par ailleurs, les aminosides, les quinolones et la colistine ont gardé globalement leur activité dans le traitement des infections à entérobactéries. Notons toutefois que l'imipénème et l'amikacine restent les antibiotiques les plus actifs.

De plus, l'épidémiologie des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries, est en perpétuelle évolution dans en Algérie. Notre étude, nous a permis de montrer que les  $\beta$ -lactamases du groupe *CTX-M* en particulier *CTX-M-3* et *CTX-M-15*, sont les principales BLSE décrites en Algérie, avec une émergence de nouveaux gènes de type *bla<sub>SHV</sub>* (*bla<sub>SHV-12</sub>*), *bla<sub>TEM</sub>* (*bla<sub>TEM-167</sub>*); *bla<sub>CMY</sub>* (*bla<sub>CMY-2</sub>* et *bla<sub>CMY-16</sub>*). On rapporte ainsi pour la première fois en Algérie, la détection des gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*) aux quinolones (*qepA1*, *qepA3* et *oqxAB*) et à la colistine (*mcr-1*) chez des souches cliniques d'*E. coli*, ainsi que la détection d'autres gènes déjà rapportés en Algérie conférant la résistance aux aminosides (*aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aadA* et *aadB*), au quinolones (*aac(6')-Ib-cr*, *qnr(A, B, S, C, D)*) et au triméthoprim/sulfaméthoxazole (*dfp* et *sul*).

La prise en charge du problème des entérobactéries productrices de BLSE est un véritable défi, du fait de la diversité et de l'ubiquité des gènes codant ces enzymes et de l'endémicité progressive de ces souches parmi les patients admis en soins intensifs, hôpitaux et la population générale (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). Ainsi, des analyses moléculaires sont nécessaires et paraissent indispensables pour une compréhension et une réaction plus adaptée à l'émergence de ces bactéries multirésistantes, d'autant plus qu'elles permettent de rattacher les événements locaux à ceux observés à l'échelle mondiale.

Une meilleure maîtrise en termes d'hygiène hospitalière (renforcement de la formation du personnel aux règles préventives, précocité du dépistage. . .) et un meilleur contrôle de la consommation d'antibiotiques au sein de l'établissement seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques dans les hopitaux algériens (**Belmonte, 2010**).



*Références  
bibliographiques*

### A

**AbuOun M**, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother.* oct 2017;72(10).

**Ahoyo A.T., Baba-Moussa L., Anago A.E., Avogbe P., Missihoun T.D., Loko F., Prévost G., Sanni A. et Dramane K. (2007).** Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Abbott Médecine et maladies infectieuses*; 37: 746-752.

**Ambler, R.P. (1980)** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289: 321-31. and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* févr 2016;16(2).

**Andriole, V.T. (2005)** The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 41: 113-9.

*Antimicrob Chemother.* déc 2017;72(12).

**Aumaître H., Lecaillon E., Ollivier S. and Bouchaud O. (2004).** Diarrhées bactériennes. *EMC Chirurgie.* 1 : 437–454.

**Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H. (2000).** *Bactériologie clinique*, Ellipses 2ième édition, Paris, France, 602 p.

**Avril J.L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H. (2000).** *Bactériologie clinique.* 3 ème édition. Ellipses édition marketing S.A. Paris. p 171-229

**Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (1992).** *Bactériologie clinique.* 2ème ed. Paris : Des préparations grandes écoles médecine .p.149-96.

**Ayad A. 2010.** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Tlemcen. Thèse de magister.

### B

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

**Bakhom I.M.N.S., (2004).** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 113 p.

**Ball, P. (2000)** Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 46: 17-24.

**Beaune J.-C. 2004.** La vie et la mort des monstres, Collection Milieux. Editions Champ Vallon ;254

- Belmonte O., Drouet D., Alba J. Moiton M.-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C. et Jaffar-Bandjee M.-C. (2010).** Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des  $\beta$ - lactamases à spectre élargi. *Pathologie Biologie*; 58: 18–24.
- Benedict, R. G. and A. F. Langlykke (1947).** "Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*." *J Bacteriol* 54(1) : 24.
- Berche P. (2003).** Bactériologie systématique D.C.E.M. 1. Faculté de médecine Necker-Enfant malade. Sur le lien : [www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeague.php](http://www.medix.free.fr/.../bacterie-diarrheeague.php)
- Bert, F., et Lambert-Zechovsky, N. (2000)** *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux  $\beta$ -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques* 2: 195-201.
- Bertrand, X., Hocquet, D., Boisson, K., Siebor, E., Plesiat, P., and 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.
- Berrazeg M. 2013.** Développement des nouveaux outils de surveillance de l'émergence des bactéries à Gram négatif multirésistantes. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, Algérie et Université Aix-Marseille, France.
- Blair, J. M., Piddock, L. J. (2009)** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol.*, 12, 512-519.
- Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De Mendonca, R., et al. (2007)** Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 59: 459-64.
- Borg, M.A., Van de Sande-Bruinsma, N., Scicluna, E., De Kraker, M., Tiemersma, E., Mone, J., et al. (2008)** Antimicrobial resistance in invasive strains of *Escherichia coli* from Southern and Eastern Mediterranean laboratories. *Clin Microbiol Infect* **14**: 789–796.
- Bonacorsi S., Houdoin V. et Bingen E. (2001).** Facteurs de virulence associés à *E. coli* responsable de méningite néonatale. Elsevier SAS. Service de microbiologie, hôpital Robert-Debré, 48, boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. *Arch Pédiatr*; 8 Suppl; 4: 726-31.
- Bonnet R. (2004).** Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 48 (1): 1-14.
- Bonnet, R. (2006)**  $\beta$ -lactamines et entérobactéries. In: Courvalin, P., Leclercq, R., Bingen, E. *Antibiogramme*. Paris. ESKA : 2<sup>ème</sup> édition 15: 141-62
- Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B.** Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* déc 2017;72(12).
- Bosgiraud, C. (2003)** *Microbiologie générale et santé*. Paris ESKA p: 278.

**Branger C. G., Torres-Escobar A., Sun W., Perry R., Fetherston J., Roland K. L. et Curtiss R. (2009).** Oral vaccination with LcrV from *Yersinia pestis* KIM delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium elicits a protective immune response against challenge with *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. *Vaccine*; 27(39): 5363-5370.

**Bryskier, A. (1999)** Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris Ellipses p: 55.

**Bush, K., Jacoby, G.A., and Meideros, A.A. (1995)** A functional classification scheme for beta-lactamase and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211–33.

**Byrne AH, Herra CM, Aucken H, Keane CT. (2001).** Rate of carriage of *Serratia marcescens* in patients with and without evidence of infection. *Scand J Infect Dis* 33: 822-826.

### C

**Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., and Threlfall, E. J. (2005).** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018

**Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al.** Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* août 2017;22(31).

**Carattoli, A. (2009)** Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2227-38.

**Carpenter J.L., (1990).** *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Reviews of Infectious Diseases*, 12 : 672-682.

**Castanheira M., Sader H. S., Deshpande L.M., Fritsche T. R. et Jones R. N. 2008.** Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52: 570-3.

**Cattoir, V. (2012)** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Rev Francoph Lab* 445: 79-87.

**Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004)** Bêtalactamines. *EMC-Mal Infect* 1: 129–202.

**Chen, H. D. and E. A. Groisman (2013).** "The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications." *Annu Rev Microbiol* 67: 83-112.

**Chen, Y.S., Wong, W.W., Fung, C.P., Yu, K.W., and Liu, C.Y. (2002).** Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacter freundii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 35(2): 109-114.

**Christensen GD, Korones SB, Reed L, Bulley R, McLaughlin B, Bisno AL. (1982).** Epidemic *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: importance of the gastrointestinal tract as a reservoir. *Infect Control* 3: 127-133.

**CHU-PS Pitié-Salpêtrière. (2003).** Bactériologie DCEM1. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie.

**Clausell, A., M. Garcia-Subirats, M. Pujol, M. A. Busquets, F. Rabanal and Y. Cajal (2007).** "Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides." *J Phys Chem B* 111(3): 551-563.

**Collignon A., Beljean-Leymarie M., Farinotti R. et Doutremepuich C. 2007.** Infectiologie. Volume de Collection Le Moniteur internat. *Le Moniteur des Pharmacies* ; 3 (3) : 354-355

**Courvalin, P., Denis, F., Ploy, M.C., garilhe, M.P.D., Trieu-Culot, P., and Universalis. (2001)** "Antibiotiques". Retrieved 24 Mai, 2013, from <http://www.universalisedu.com/encyclopedie/antibiotiques/>

**Cuzon G., Naas T. et Nordmann P. 2010.** Carbapénèmases de type KPC: quel enjeu en microbiologie clinique ? *Pathologie Biologie*; 58 (1): 38-45.

## D

**Dagnra A.-Y., Akolly K., Gbadoe A., Aho K. et David M. (2007).** Émergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé (Togo). *Médecine et maladies infectieuses*; 37 : 266-269.

**Davis, M.A., Baker, K.N.K., Orfe, L.H., Shah, D.H., Besser, T.E., and Call, D.R. (2010)** Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2666-9.

**De Champs C. (2002).** Perspective survey of  $\beta$ -lactamase produced ceftazidim. *Agent chemother*; 46(9):30-34.

**De, E., Basle, A., Jaquinod, M., Saint, N., Mallea, M., Molle, G., Pages, J. M. (2001)** A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Mol.Microbiol.*, 41, 189-198.

**Decoster A. & Lahieu J.C., (2006).** Cours de Bactériologie : Les entérobactéries. Disponible sur : <http://anne.decoster.free.fr/btelechar/bpoly/enteroba05.pdf>.

**Dedet, J. (2007).** La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Dunod.

**Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., Kawada, Y. (1997).** Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J.Antimicrob.Chemother.*, 40, 543-549.

**Denis F. et Ploy M.-C. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson. p 316-318.

- Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007)** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance.
- Doran T.I., (1999).** The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. *Clinical Infectious Diseases*, 28 : 384-394.
- Drame B., (2001).** Micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal. 115 p
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997)** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 377-92.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008)** Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 385-92
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., and Falagas, M.E. (2009)** Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* 33: 201-205

### E

- Edlund, T., Grundström, T., and Normark, S. (1979)** Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal  $\beta$ -lactamase gene of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 17: 115-25.
- Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., L.Percival, S., Chalmers, R. (2004).** *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, Elsevier.

### F

- Falagas, M. E. and S. K. Kasiakou (2005).** "Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections." *Clin Infect Dis* 40(9): 1333-1341.
- Falagas, M. E., P. I. Rafailidis and D. K. Matthaiou (2010).** "Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options." *Drug Resist Updat* 13(4-5): 132-138.
- Farmer, J.J., Boatwright, K.D., and Janda, J.M. 2007. *Enterobacteriaceae: Introduction and identification. Manual of Clinical microbiology*. Washington, DC, USA: ASM press. 9th ed: 649-669.
- Fauchère, J. L., Avril, J. L. (2002).** *Bactériologie générale et médicale*. Ed Ellipses. Paris. P.368.
- Ferech, M., and Coenen, S. 2006.** "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe." *J Antimicrob Chemother*. 58(2): 401-407.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S. 2005.** Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev*. 105: 395-424.

**Frasca D., Dahyot-Fizelier C. et Mimosz O. 2008.** La colistine en réanimation. *Réanimation*; 17: 251-258.

**Freney J, Girardo P, Freydière A M, Renaud F N R. (2006).** Entérobactéries biologie Clinique ; pages 1-2.

**Fritsche, T.R., Castanheira, M., Miller, G.H., Jones, R.N., and Armstrong, E.S. (2008)** Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1843–5

### G

**Galimand, M., Courvalin, P., and Lambert, T. (2003)** Plasmid-mediated highlevel resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2565-71.

**Gniadkowski M. 2001.** Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect*; 7: 597-608

**Goubau P. et Pellegrims E. (2000).** Repères en microbiologie. Garant, Édition3. p 116-117.

**Gras G, Choutet P.** Prescription et surveillance des antibiotiques. *La Revue du Praticien*. 2010; 60: 573-579

**Grattard, F. (2007)** Electrophorèse en champs pulsé. In Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., and Riegel, P. *Précis de bactériologie clinique*. ESKA Paris p: 291-302.

**Grimont F. et Grimont P.A.D. 2006.** The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*; 6:197–214.

**GARDIEN E, OLIVE C, CHOUT R, GARCERA Y, JOUANNELLE J.** Les entérobactéries hospitalières en Martinique en 1995 : distribution des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de 4 511 souches, urinaires et non urinaires. *Méd. Mal. Infect.* 1997, 27 : 888-92

### H

**Hancock, R. E. (1997).** "Peptide antibiotics." *Lancet* 349(9049): 418-422.

**Hart, C.A. (2006).** *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp. Principles and practice of Clinical Bacteriology*. England, UK: John Wiley and Sons Ltd. 2nd ed: 377- 386.

**Honoré S., Lascols C., Malin D., Targaouchi R., Cattoir V., Legrand P., Soussy C.J., Cambau E., (2006).** Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital HenriMondor 2002-2005). *Pathologie Biologie*, 54 :270-279

**Hooper, D. C. (2000)** Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin.Infect.Dis.*, 31 Suppl 2, S24-S28.

**Hooper, D.C., and Rubinstein, E. (2003)** Quinolone antimicrobial agents. *Americ Soc Microbiol* p: 485.

### I

**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 p.

### J

**Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2006).** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria. Washington, USA: ASM Press: 115-129.

**Jarlier V Nordmann P.** 2000 Entérobactéries et  $\beta$ -lactamines in freney J,Renaud F , Hansen W , Bollet C précis de bactériologie clinique. Paris : Editions ESKA-Alexander Lacassagne P.649-655

**Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and 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: 867–78.

**Jaurin, B., Grundstroëm, T., and Normark, S. (1982)** Sequence elements determining ampC promoter strength in *E. coli*. *EMBO J* 1: 875-81.

**Jean-Jacques Lefrere. (2000).** Transfusion sanguine: une approche securitaire, Montrouge, France: J. Libbey Eurotext.

**Joly B. et Reynaud A. (2007).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 3-182.

### K

**KADO C.I, LIU S.T.** Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bactériologie* 1981, 145(3) : 1365-1373

**Katz, E. and A. L. Demain (1977).** "The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions." *Bacteriol Rev* 41(2): 449-474

**Kieser T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*; 12: 19-36

**Knirel Y.A., Kocharova N.A., Bystrova O.V., Katzenellenbogen E. & Gamian A., (2002).** Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus *Citrobacter*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentals*, 50 : 379-391.

**Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2007).** "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." *Cell* 130(5): 797-810.

**Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., and Connolly, L.E. (2016).** Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med 6.

**Kwa, A. L., V. H. Tam and M. E. Falagas (2008).** "Polymyxins: a review of the current status including recent developments." Ann Acad Med Singapore 37(10): 870-883.

### L

**Lambert T., Courvalin P. (2000).** Entérobactéries et aminosides. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C (eds). Précis de Bactériologie Clinique. ESKA, Paris: 666-677.

**Lambert, T. (2006)** Aminosides et bactéries à GRAM négatif. In. Courvalin, P., Leclerck, R., and Bingen, E. AntibioGramme. Paris ESKA 2<sup>ème</sup> édition 19: 227-46.

**Lamnaouer D. (2002).** Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord: Phase III. Etat d'avancement. p 3-7.

**Lautenbach E., Weoltje K. et Malani P. 2010.** Practical Healthcare Epidemiology. University of Chicago Press. Third Edition. p 212-213.

**Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., and Ben Moussa, M. (2014)** Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). Méd mal infect 44: 400-4.

**Le Noc, P. (1999).** Monobactames in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. Ed Ellipses. 374-391.

**Lehner, A., Roger, S., Fanning, S., and Iversen, C. (2011) .** Enterobacter In : molecular detection of human bacterial pathogens. USA, CRC. 853-863.

**Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998)** DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochim Biophys Acta 1400: 29-43

**Li X-Z., Mehrotra M., Ghimire S. et Adewoye L. 2007.**  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary Microbiology; 121: 197-214

**Liu Y-Y, Wang Y , Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. févr 2016;16(2).

**Liu, J.H., Deng, Y.T., Zeng, Z.L., Gao, J.H., Chen, L., Arakawa, Y., et al. (2008)** Coprevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA Methylase RmtB-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. Antimicrob Agents Chemother 52: 2992-3.

**Livermore D.M. et Woodford N. 2006.** The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology; 14: 413-20.

**Livermore, D.M. 1995.** "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clin Microbiol Rev.* 8(4): 557-584

**Low, A.S., McKenzie, F.M., Gould, I.M., and Booth, I.R. (2001)** Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol Microbiol* 42: 619-30

### M

**Mahlen SD. (2011).** Serratia infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* 24: 755-791.

**Mahrouki S., Ben-Achour N., Chouchani C., Ben-Moussa M. et Belhadj O. (2009).** Identification of plasmid-encoded extended spectrum  $\beta$ -lactamases produced by a clinical strain of *Proteus mirabilis*. *Pathologie Biologie*; 57: 55- 59.

**Maiden, M.C. (2006)** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561- 88.

**Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., et al. (1998)** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3140-5.

**Martinez, M., P. L. Toutain, et al. (2006).** The pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) relationship of antimicrobial agents. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. S. Giguère, J. Prescott, J. Desmond Baggot, R. Walker and P. Dowling. Oxford, Blackwell Publishing: 81-106.

**Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., et al. (2009)** Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 63: 67–71.

**Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., and Frere, J.M. (1999).** The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat Prod Rep.* 16: 1-19

**Messai L., Achour W. et Ben Hassen A. 2007.** Profil épidémiologique des entérobactéries isolées chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie*;55: 230-234.

**Meyer A., Deiana J. et Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. Editions 2 Doin. p 430.

**Minarini, L. A., Darini, A. L. (2012).** Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz.J.Microbiol.*, 43, 1309-1314.

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

**Mirabaud M. I. 2003.** Entérobactéries à  $\beta$ -lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. La Faculté de Médecine de l'Université de Genève. Thèse de Doctorat en médecine.

**Molitor. A. (2010)** Thèse de Doctorat : Régulation de la perméabilité membranaire chez les bactéries à Gram négatif et la relation avec la sensibilité aux antibiotiques. Université de Médecine, Marseille, France.

**Mnif, B., Harhour, H., Jdidi, J., Mahjoubi, F., Genel, N., Arlet, G., et al. (2013)** Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol* **13**: 147.

### N

**Naas T. (2003).** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche *Acinetobacter baumannii* productrice de la  $\beta$ -lactamase VEB-1. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène (P. Nordmann), CHU de Bicêtre. *Journal of Clinical Microbiology*; 41: 3542-7.

**Nauciel C. (2000).** Bactériologie médicale: connaissance et pratique. Edition Masson. Paris. p 125-146.

**Neuwirth, C., Siebor, E., Lopez, J., Pechinot, A., and Kazmierczak, A. (1996)** Outbreak of TEM-24-Producing *Enterobacter aerogenes* in an Intensive Care Unit and Dissemination of the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase to Other Members of the Family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 34: 76–9.

**Nguyen, J.C., and Lambert, T. (2012)** Interpretative analysis of aminoglycoside resistance by the antibiogram. *Rev Francoph Lab* 445: 75-77

**Nikaido, H. (2003)** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 67, 593-656

**Nordmann P. Cuzon G. et Naas T. 2009.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*; 9: 28-36

**Nordmann P. et Mammeri H. 2007.** Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques*; 9: 246-53

**Norman, A., Hansen, L.H., She, Q., and Sørensen, S.J. (2008)** Nucleotidesequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 60: 59–74.

### O

**O'Donnell, J. A., Gelone, S. P. (2000)** Fluoroquinolones. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 14, 489- 513, xi.

**Olaitan, A. O., S. Morand and J. M. Rolain (2014).** "Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria." *Front Microbiol* 5: 643.

### P

- Paltansing, S., Kraakman, M. E., Ras, J. M., Wessels, E., Bernards, A. T. (2013)** Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an Escherichia coli ST131 clone with a specific mutation in parE. *J.Antimicrob.Chemother.*, 68, 40-45.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., and Jacoby, G.A. (1990).** Novel plasmid-mediated beta[1]lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2200-9
- Patel J. B., Kamile Rasheed J. et Kitchel B. 2009.** Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter*; 31 (8): 55–62.
- Paterson D.L. et Bonomo R.A. 2005.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*; 18: 657-86
- Paterson D.L. 2006.** Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am JMed*; 119 (1): 20-8.
- Peirano G. et Pitout J.D.D. (2010).** Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 35: 316-321
- Pelmont J. (2005).** Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. Collection Grenoble sciences. L'Editeur : EDP Sciences. p 124-125.
- Pepperell, C., Kus, J.V., Gardam, M.A., Humar, A., and Burrows, L.L. 2002. Low-Virulence Citrobacter Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. *Antimicrob.. Agents Chemother.* 46(11): 3555-3560.
- Perichon, B., Courvalin, P., and Galimand, M. (2007)** Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2464–9.
- Péan Y., Goldstein F.W. et De Bels F. 2001.** Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. *Méd Mal Infect*; 31: 609-21.
- Philippon, A., and Arlet, G. (2006)** Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! *Ann Biol Clin* 64: 37-51.
- Podschun R. & Ullmann U., (1998).** Klebsiella spp. as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Review*, 11 : 589-603.

**Poirel L, Jayol A, Nordmann P.** Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* avr 2017;30(2).

**Popoff M.Y. (2001).** Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 8th ed. WHO Collaborating center for reference and research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.

**Pourriat J.-L. et Martin C. (2005).** Principes de réanimation chirurgicale. Editions 2 Arnette. p 1430

**Prescott, L.M., J. Harley and D-A. Klein. (2003).** Microbiologie 5eme édn. Bruxelles, Belgium: De Boeck Université.

### Q

**Qureshi Z.A., Paterson D.L., Pakstis D.L., Adams-Haduch J.M., Sandkovsky G., Sordillo E., Polsky B., Peleg A.Y., Bhussar M.K. & Doi Y. (2011).** Risk factors and outcome of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37 : 26-32.

### R

**Ramirez, M.S., and Tolmasky, M.E. (2010)** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13: 151-71.

**Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. (2012)** Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

**Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. (2015)** Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques

**Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., et al. (2006).** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-88.

**Rodriguez-Villalobos H. et Struelens M.-J. (2006).** Résistance bactérienne par  $\beta$ lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*; 15: 205- 213

**Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTXM. *Antibiotiques*; 12(1): 3–16.

**Ryan, K.J. (2004).** Enterobacteriaceae. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases.* USA: McGraw-Hill. 4th ed: 343-371.

### S

**Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.

**Schroeder, W.A., Locke, T.R., and Jensen, S.E. (2002).** Resistance to beta-lactamase inhibitor protein does not parallel resistance to clavulanic acid in TEM beta-lactamase mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3568-3573.

**Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984).** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.

**Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., La, S.B., Drancourt, M., and Raoult, D. (2010)** MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5: 1733-54." *Annu Rev Biochem* 46: 723-763.

**Sekhsoxh Y., Chadli M. et El Hamzaoui S.A. 2008.** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et maladies infectieuses*; 38 : 324-327.

**Seonghan K., Jinxin H., Romesh G., Junyoung K., Bokkwon L. et Boyle D.S. 2007.** CTX-M Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases. Washington State. Washington Department of Health, Shoreline, Washington, USA; and †Korea Centers for Disease Control and Prevention, Seoul, Republic of Korea. *EID Journal Home*; 13(3): 513-514

**Souna D. 2010.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. Mémoire de Magister en Biologie

**Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., and Khan, A.U. (2008).** Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 15: 5-14.

**S.L., (2007).** Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC : ASM press, 9 : 698-715.

**Sirot, J. (1996).** Detection of extend-spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. *Clin Microbiol Infect* 2: 35-9.

**Skurnik D. et Andremont A. (2006).** Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique. *Réanimation*; 15: 198-204.

**Soude S.G.A.A. (2005).** Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga De Cotonou. Thèse pour l'obtention du grade

de Docteur en pharmacie diplôme d'état. République du Mali, université de Bamako, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

**Soussy, C.J. (2006)** Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In: Courvalin, P., Leclerck, R., and Bingen, E. *Antibiogramme*. Paris ESKA 2<sup>ème</sup> édition 21: 261-77

**Stone P.W., Gupta A., Loughrey R.N., Della-Latta P.H., Cimiotti R.N., Larson E., Rubenstein D. & Saiman L., (2003).** Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24 : 601- 606.

**Storm, D. R., K. S. Rosenthal and P. E. Swanson. (1977).** "Polymyxin and related peptide antibiotics.

### T

**Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., et al. (1995)** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233–9.

**Thiolas, A., Bollet, C., La, S. B., Raoult, D., Pages, J. M. (2005)** Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 1354-1358.

**Tidrarine Soukaina. (2019).** Epidémiologie des entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénèmase à l'HIT. Thèse de doctorat. (Virifie)

Tindall B.J., Grimont P.A.D., Garrity G.M., Euzéby J. (2005), Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*; 55: 521-524.

**Tipper, D. J. (1985).** "Mode of action of beta-lactam antibiotics." *Pharmacol Ther* 27(1): 1-35.

**Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., and De Champs, C. (2006)** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 B-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 27: 397–402.

**Trigoso C. (2010).** Carbapenemases: A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. *Pediatr Infect Dis J*; 29(1): 68-70

**Trystram, D., Chardon, H., Péan, Y., Delarbre, J.M., Costa, Y., Maugat, S., et al. (2013)** Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARS-NET) : résultats 2001-2010 pour la France et place en Europe. *J Péd Puéricult* 26: 73-78.

### V

**Vakulenko, S.B., and Mobashery, S. (2003)** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16: 430-50

**Vander-Stichele, R.H., Elseviers, M.M., Ferech, M., Blot, S., Goossens, H., and European Surveillance of Antibiotic Consumption (ESAC) Project Group. 2006.** "Hospital consumption

**Vidon O. et Bourdin C. (2005).**  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Intérêt porté aux CTX-M. Sur le lien : [umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/.../BétaLactamasesSpectre Etendu..BétaLactamases...](http://umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/.../BétaLactamasesSpectre Etendu..BétaLactamases...)

### W

**Wachino, J., and Arakawa, Y. (2012)** Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 15: 133–48.

**Walsh T.R. 2010.** Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 36(3): 1-8

**Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al.** Emergence of a novel mobile colistin gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* juill 2018;7(1).

**Weill F.-X. (2009).** Salmonella: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Centre national de référence des Salmonella Laboratoire des bactéries pathogènes émergentes. Institut Pasteur Elsevier Masson SAS. *Revue Francophone Des Laboratoires. Supplément Au N°409* : 25.

**Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., et al. (2004)** Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 54: 735–43.

### X

**Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al.** Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* juill 2016;21(27).

**Xavier N., Hervé G. and Le Guen P. (2007).** Shigellose ou dysenterie bacillaire. *J. Exp. Med.* 36: 1606–18.

### Y

**Yahav, D., L. Farbman, L. Leibovici and M. Paul (2012).** "Colistin: new lessons on an old antibiotic." *Clin Microbiol Infect* 18(1): 18-29

**Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., et al. (2007)** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3354-60

**Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., et al. (2007a)** 16S rRNA methylase-producing gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infect Dis* 13: 642- 6.

**Yanat, B., Dali Yahia, R., Yazı, L., Machuca, J., Díaz-De-Alba, P., Touati, A., et al. (2016)** Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance *qepA1* Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist*

**Yang Y-Q, Li Y-X, Lei C-W, Zhang A-Y, Wang H-N.** Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* avr 2018

**Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al.** Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio.* juin 2017;8(3).

**Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997)** Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11: 2580-92.



*ANNEXES*

# Annexe1. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes(Algérie)

## Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes (Algérie)

SOUNA Djahida\*, SEFRAOUI Imane, DRISSI Mourad

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, phyto-chimie, synthèse et activité biologique, Faculté des Sciences de la nature et de vie des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid, BP. 113, Tlemcen 31000, ALGERIE

### RÉSUMÉ

L'étude de 140 souches d'entérobactéries, isolées de différents services de l'hôpital de Sidi Bel Abbes entre octobre 2009 et mai 2010, montre qu'*Escherichia coli* occupe la première place (37,1%) suivie de *Klebsiella pneumoniae* (21,4%), de *Proteus* spp. (19,3%) et d'*Enterobacter cloacae* (18,6%). Les résultats de l'antibiogramme pour 27 antibiotiques (18 β-lactamines, 4 aminosides, 3 quinolones, colistine et triméthoprime/sulfaméthoxazole) par la méthode de diffusion en milieu gélosé, selon les normes du CA-SEM, ont révélé l'émergence des souches résistantes aux β-lactamines et à la majorité des autres classes d'antibiotiques sauf pour l'amikacine et l'imipénème (3,0% et 4,3% respectivement). L'analyse des phénotypes de résistance aux β-lactamines est en faveur d'une dominance des souches productrices de β-lactamase à spectre étendu (BSE) (37,1%), pour lesquelles plusieurs profils plasmidiques ont été détectés dont un plasmide commun de poids moléculaire supérieur à 55 kb.

Mots clés: Entérobactéries Algérie-antibiotiques-résistance-BSE.

### ABSTRACT

Antibiotic resistance of Enterobacteria in Sidi Bel Abbes Hospital (Algeria).

The study of 140 strains of Enterobacteriaceae isolated from various units in the hospital of Sidi Bel Abbes between October 2009 and May 2010, shows that *Escherichia coli* is ranked first (37.1%) followed by *Klebsiella pneumoniae* (21.4%), *Proteus* spp. (19.3%) and *Enterobacter cloacae* (18.6%). The results of antibiogram for 27 antibiotics (18 β-lactams, 4 aminoglycosides, 3 quinolones, colistin and trimethoprim / sulfamethoxazole) by the disk diffusion method in agar medium, according to CA-SEM, revealed the emergence of strains resistant to β-lactam antibiotics and most other classes of antibiotics except the amikacin and imipenem (3.0% and 4.3% respectively). Analysis of resistance phenotypes to β-lactams antibiotics is in favor of a dominance of strains producing extended-spectrum β-lactamase (ESBL) (37.1%), for which several plasmid profiles were detected including a plasmid common with molecular weight greater than 55 kb.

Key words: Enterobacteria Algeria-antibiotics-resistance-ESBL.

### 1. Introduction

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bactéries à Gram négatif responsables d'infections humaines graves. Les espèces de cette famille ont été depuis une vingtaine d'années largement exposées à une utilisation extensive des antibiotiques. Face à la perte de la médaille, elles n'ont pas été épargnées par la résistance croissante aux molécules les plus fréquemment utilisées. La résistance que les Entérobactéries ont est un problème important qui nécessite une attention immédiate, plus particulièrement avec l'apparition des β-lactamases à spectre étendu (BSE) [1]. Le but de notre étude a été d'évaluer la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées au centre

hospitalo-universitaire (CHU) Hassani Abdelkader à Sidi Bel Abbes (Algérie).

### 2. Matériel et méthodes:

#### 2.1. Souches bactériennes:

Durant la période d'étude allant d'octobre 2009 à mai 2010, 250 prélèvements (patient et environnement), à visée épidémiologique, ont été effectués à partir de différents services du CHU Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbes (dans l'ouest Algérien).

\* Correspondance: SOUNA Djahida, Laboratoire: antibiotiques, antifongiques, phyto-chimie, synthèse et activité biologique, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, CP. 113 Larbi Ben Mhidi Hennes, Tlemcen 31000 Algérie. E-mail: souna.microbiologie@yahoo.fr

37

14,3%, produisent également une céphalosporine associée. Le phénotype céphalosporine hyperproduite seul a concerné 6 souches (4,3%). 25% des souches ont présenté le phénotype pénicillamine, majoritairement observé chez *Escherichia coli*. Le reste des souches (55,6%) ont présenté le phénotype Souches. Dans cette étude, 6 souches, dont 3 *Enterobacter cloacae* et 3 *Proteus* spp. ont présenté une résistance intermédiaire avec des valeurs de CIM de 2 à 4 µg/ml vis-à-vis de l'imipénème. Pour ces tests de Hodje et de l'EDTA ont été réalisés afin de détecter d'éventuelle production de carbapénèmes. Le test de Hodje, bien que facile à réaliser et ne préjuge en rien de l'identification de la β-lactamase en cause, est parfois difficile à

interpréter. Pour le test de l'EDTA, aucune image de synergie n'a été détectée.

### 3.3. Résistances associées

Pour les souches produisant une BSE ou une BSE-CASE, l'amikacine s'avère la molécule la plus active, les autres aminosides présentant un fort risque d'échec thérapeutique. L'association triméthoprime / sulfaméthoxazole et les quinolones présentent également un taux de résistance considérable. En revanche, pour les souches qui produisent une céphalosporine ou une pénicillamine, les aminosides sont modérément affectés alors que les quinolones présentent une efficacité limitée avec près d'une souche résistante sur 2. L'amikacine resta la molécule de référence avec une sensibilité totale (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de souches résistantes (%) aux autres classes d'antibiotiques en fonction des phénotypes de résistance aux β-lactamines.

Antibiotiques	TM	GM	AN	K	NA	OFX	CP	CS	SXT	N (%)
Phénotypes										
BLSE	30	11	2	15	23	21	17	6	30	32
	(9,7)	(9,8)	(6,2)	(6,5)	(7,8)	(65,6)	(53,1)	(18,7)	(93,7)	(22,8)
BLSE-CASE	19	18	3	7	13	12	12	2	18	20
	(9,5)	(9,0)	(1,5)	(6,3)	(6,0)	(6,0)	(10)	(9,0)	(14,3)	
CASE	1	1	0	0	3	3	3	2	2	6
	(16,7)	(16,7)	(0)	(0)	(50)	(50)	(50)	(33,3)	(4,3)	
PASE	6	4	0	11	19	17	11	9	29	35
	(17,1)	(11,4)	(0)	(42,3)	(54,3)	(48,6)	(31,4)	(25,7)	(82,8)	(25)
Souveau	3	0	0	0	7	5	4	14	5	47
	(6,4)	(0)	(0)	(0)	(14,9)	(10,6)	(8,5)	(29,8)	(10,6)	(33,6)

BLSE: β-lactamase à spectre élargi; CASE: céphalosporinase; PASE: pénicillinase; TM: tobramycine; GM: gentamicine; AN: amikacine; K: kanamycine; NA: acide nalidixique; OFX: ofloxacine; CP: ciprofloxacine; CS: colistine; SXT: triméthoprime/sulfaméthoxazole; N: nombre total de souches isolées.

### 3.4. Conjugaison bactérienne:

Sur les 29 souches qui ont fait l'objet du test de conjugaison, 18 ont transféré une partie de leurs caractères de résistance à la souche réceptrice, soit 62,1%. L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants, par la méthode de diffusion en milieu solide, a montré le transfert de la résistance aux β-lactamines, aux aminosides et au triméthoprime/sulfaméthoxazole pour la majorité des souches. Par contre pour les 11, le transfert de la résistance est constaté seulement quelques souches.

### 3.5. Extraction et visualisation des plasmides:

L'analyse du contenu plasmidique de 8 souches d'entérobactéries ainsi que de leurs transconjugants respectifs a permis de visualiser la taille et le nombre de plasmides hébergés par ces transconjugants, par la méthode de diffusion en milieu solide, a montré le transfert de la résistance aux β-lactamines, aux aminosides et au triméthoprime/sulfaméthoxazole pour la majorité des souches. Par contre pour les 11, le transfert de la résistance est constaté seulement quelques souches.

### 2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques:

L'antibiogramme a été réalisé selon la technique de référence de diffusion en milieu gélosé (Muller-Hinton) vis-à-vis de 27 antibiotiques (18 β-lactamines, 4 aminosides, 3 quinolones, colistine et triméthoprime/sulfaméthoxazole). La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été effectuée en milieu gélosé et a concerné les antibiotiques suivants: l'imipénème, la céfotaxime, l'atroranone, la céfotaxime, la ceftazidime, la cefépime, la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine, la ciprofloxacine et la rifampicine. L'interprétation des résultats s'en fait sur la base des recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [2].

### 2.3. Recherche de la production de BSE:

Pour certaines souches, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hyperproductions de céphalosporinases des β-lactamases à spectre élargi (BSE). La recherche de synergie lors du test de Hodje et de l'EDTA a été réalisée sur gélose MH additionnée de cloxaciline avec une concentration finale de 250 µg/ml.

### 2.4. Recherche de la production de carbapénèmes:

Deux techniques phénotypiques ont été réalisées pour les souches qui présentent des CIM de plus de 2 µg/ml vis-à-vis de l'imipénème, afin de rechercher la présence probable des carbapénèmes dans notre échantillon. Ces techniques ont été réalisées tel que décrites précédemment: le test de Hodje [3], le DDST (Double-disk synergy test) et le CDT (The combination disc test) [4]. Un témoin positif correspondant à une souche d'*Escherichia coli* productrice du metallo-β-lactamase VIM-1 a été utilisé.

### 2.5. Conjugaison bactérienne:

Des expériences de conjugaison, réalisées entre la souche de référence *Escherichia coli* résistante à la rifampicine (R1 Rif R) et 29 souches d'entérobactéries, sont telles que rapportées précédemment [5]. Les transconjugants ont été sélectionnés sur gélose Mac Conkey contenant du céfotaxime et de la rifampicine à des concentrations finales de 16 µg/ml et de 256 µg/ml respectivement.

### 2.6. Extraction de l'ADN plasmidique:

L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée par la technique de lise alcaline en présence de 38

détergent (SDS) [6], puis l'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode de choix pour la séparation, la purification et l'identification des fragments d'ADN [7]. La taille des plasmides a été estimée par comparaison avec des plasmides de taille connue de la souche *Escherichia coli* V.517.

### 3. Résultats:

140 entérobactéries ont été identifiées, parmi un total de 240 bacilles à Gram négatif, avec une fréquence d'isolement de 56%. L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches d'entérobactéries isolées, a montré une prédominance d'*Escherichia coli* (37,1%), suivie de *Klebsiella pneumoniae* (21,4%), *Proteus* spp. (19,3%) et d'*Enterobacter cloacae* (18,6%). Les autres entérobactéries viennent en dernière position avec 5 isolats soit 3,6%.

### 3.1. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques:

Les résultats des antibiogrammes ont fait ressortir l'émergence des souches résistantes à la majorité des antibiotiques testés sauf pour l'imipénème et l'amikacine soit 95,7% et 96,4% respectivement des souches sensibles. Les taux de résistances aux β-lactamines étaient les suivants: ampicilline (55%), amoxicilline (56,4%), amoxicilline/clavulanate (76,4%), ticarcilline (77,8%), ticarcilline/acide clavulanate (65%), piperacilline (58,6%), piperacilline/azobactam (20,7%), céfotaxime (62,8%), céfuroxime (58,6%), cefépime (29,3%), ceftazidime (44,3%), céfotaxime (44,3%), ceftriaxone (47,1%), atroranone (39,3%), cefépime (38,8%), et cefepime (40%).

Pour les aminosides, le taux le plus important a été observé pour la tobramycine (42,1%) suivi de la gentamicine (36,6%) et de la kanamycine (35%). En ce qui concerne les fluorocinolones, les taux de résistance étaient de 41,4% pour l'ofloxacine et 33,6% pour la ciprofloxacine. Par contre l'acide nalidixique est toutefois moins efficace avec 46,4% de souches résistantes. Une activité importante a été remarquée vis-à-vis de la colistine, soit 24,2%, en tenant compte que cette molécule est totalement inactive sur la souche de Protéus. Enfin, une activité faible a été observée vis-à-vis du triméthoprime/sulfaméthoxazole avec un taux de 60%.

### 3.2. Phénotypes de résistance:

L'analyse du comportement des entérobactéries vis-à-vis des β-lactamines a permis de classer les souches en fonction de leur phénotype de résistance. Les résultats sont en faveur d'une production de β-lactamase à spectre étendu (BSE) chez 37,1% des souches par exemple, soit 20, soit

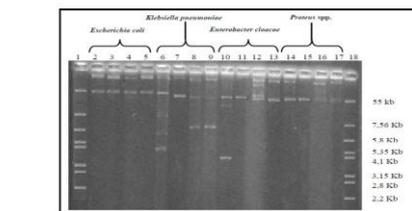


Figure 1. Profils plasmidiques des 4 espèces d'entérobactéries et de leurs transconjugants.

### 4. Discussion:

L'hôpital ou à un lieu notre étude est le centre hospitalo-universitaire Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbes, contenant 639 lits, accueillant des enfants et des adultes, avec 23 services d'hospitalisation et 7 services d'exploration. Entre octobre 2009 et mai 2010, 240 bacilles à Gram négatif ont été isolés à partir de différents services. Les entérobactéries dominent dans notre étude avec une fréquence d'isolement de 56% par rapport à 40% des bacilles à Gram négatif (BGN) non fermentants. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus au Maroc [8], en France [9] et au Cameroun [10]. Les souches d'entérobactéries ont été retrouvées dans tous les types de services. Cependant, certaines spécialités sont apparues plus concernées dont la réanimation et la chirurgie avec 27,8% et 26,4% respectivement.

Dans l'ensemble des entérobactéries isolées, *Escherichia coli* reste l'espèce la plus fréquente (37,1%), suivie par *Klebsiella pneumoniae* (21,4%), comme cela est rapporté par plusieurs études [11, 12].

Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3ème génération (CG3) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de β-lactamases à spectre élargi (BSE) [13]. Ainsi 37,1% des souches étudiées sont productrices de β-lactamases à spectre élargi (BSE). Cette valeur se rapproche de

celle obtenue en Tunisie (30,2%) [11] et en Egypte (38,5%) mais supérieure à celle rapportée en Allemagne (2,6%) et en Hollande (2%) [14]. Cependant, on note que le nombre des souches productrices de BSE est plus important chez l'espèce *Klebsiella pneumoniae* avec 80% qui correspond aux résultats obtenus par Saibouh (2007) [15] et par Edalstein et al. (2003) [16]. Le taux d'isolement des souches présentant le phénotype BLSE est plus important en réanimation (48,7%) qu'en chirurgie, ou autres services signalés, ce qui est certainement lié à l'utilisation abusive voire massive des antibiotiques en soins intensifs.

L'incidence d'apparition des résistances aux aminosides a augmenté ces derniers années et particulièrement chez les souches productrices de BSE [17]. Les niveaux de résistance de ces souches dans notre étude ont été plus importants. L'amikacine reste la molécule la plus efficace avec 96,4% de souches sensibles comme cela est rapporté dans plusieurs études [18, 19]. Les quinolones montrent une activité moyenne, la sensibilité globale des souches chutant considérablement dans le cas des souches productrices de BSE. Pour la majorité des souches, la résistance acquise est la conséquence d'une mutation, ce qui limite sa diffusion [20].

Les résultats de la visualisation des plasmides sur gel d'agarose semblent révéler que les gènes codant pour cette résistance sont situés sur des plasmides de taille supérieure à 55 kb chez les souches ayant transféré le phénotype BSE et qui

souvent, portent des déterminants de la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ce qui peut expliquer que les bactéries qui les hébergent deviennent multi-résistantes.

Les carbapénèmes sont les traitements de choix des infections sévères causées par les entérobactéries productrices de BSE [21]. La résistance des entérobactéries à ces molécules reste encore un phénomène marginal [22]. Dans notre étude, 4,3% des souches présentent une résistance intermédiaire à l'imipénème. Cette baisse de la sensibilité pourrait être le résultat d'une modification des porines, associée à la production de β-lactamases de type BSE ou AmpC, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane externe [23]. Le plus inquiétant serait la production de carbapénémases, puisque l'activité des carbapénèmes peut être compromise par l'émergence de ces enzymes [24].

Une meilleure maîtrise de l'hygiène hospitalière et un meilleur contrôle de la consommation d'antibiotiques au sein de l'établissement seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques [18].

### Références:

- Paterson D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medicine 2006; 119(Suppl 20-28).
- CA-SEM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie 2010; <http://www.afm.asso.fr/>.
- Casas O, Nasa T, Macdonald P. Carbapénèmes de type KPC: quel enjeu en microbiologie clinique ? Pathologie Biologie 2005; 53(1): 39-45.
- Gebeli L, Bektaşoğlu P, D. Hatızlı D, Pheçourou D, Souli M et Giamarelou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of Metallo-β-lactamase production in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009; 61: 148-153.
- Toussaint A, Benabdou S, Forti D, Madoux A, Brasseur L et De Champs C. First report of CTX-M 15 CTX-M β-lactamase among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Belgium. Antimicrobial Journal of Antimicrobial Agents 2002; 7: 397-402.
- Kado CI et Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriology 1981; 143(9): 1365-1373.
- Sambrook J et Russell DW. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring, Vol 1, 2001.
- Elouennas M, Salvooni L, Zera A, Balgou T et Elharzouli S. Epidemiologie et profil de sensibilité des isolats d'Entérobactéries dans un service de réanimation (2002-2005). Médecine et maladies infectieuses 2008; 38: 18-24.
- Zoghbi E et Dupont H. Entérobactéries multirésistantes. Elsevier SAS, 2005: 153-165.
- Campoux P, Kaddaoui S, Agnassou F, Adjaou D, Njimi T et Bekarba P. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolated from inpatients and outpatients at Yaoundé Central Hospital, Cameroon. International Journal of Infectious Diseases 2004; 8: 147-154.
- Messai I, Achour W et Ben Hassou A. Profil épidémiologique des entérobactéries isolées chez des patients neurologiques. Pathologie Biologie 2007; 55: 230-234.
- Nadria H, Ekstam E, Talini M, Zennouli K, Ferrer-Grochou Claude JD et Timinouni M. Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes commensales à El Hadjia (Maroc). Médecine et maladies infectieuses 2010; 40: 309-305.
- Sobrinho O, Drouot D, Alla S, Molton M-P, Kull G, Lappage-Delpon N, Mourlan C et Jarraf-Bandjee M-C. Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion: émergence des β-lactamase à spectre élargi. Pathologie Biologie 2010; 58: 18-24.
- Ho P-T, Tsang OMC, Que TL, Ho M et Yuen KY. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β-lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Hong Kong. APMS 2000; 108: 237-240.
- Sekhouch M, Anasba L, El Ouennas M, Doublati T, Baljou T et Labou Amine L. Bactériémie à *Serratia rubroaeruginosa*. Médecine et maladies infectieuses 2007; 37: 287-290.
- Gebelin M, Piskin M, Palagin I, Eddebou S et Strabouhoul L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospital. Antimicrobial Agents Chemotherapy 2007; 47: 374-372.
- Squao T, Luzzano F, Periti M, Antonietti G, Tonello A et Fadda G. Occurrence of extended-spectrum β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to β-lactams and other microbial drugs. Antimicrobial Agents Chemotherapy 2000; 46: 196-202.
- Ben haj Khalifa A et Kheher M. Fréquence et profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires dans un CHU de Tunis: à propos de 1930 cas. Médecine et maladies infectieuses 2003; 33: 348-352.
- Gulbayrak D, Woodford M, Pappas M, F. Muehleberg A, Matan G, Yakupogullari Y, Kocoglu S, Uzung O, Hasciklik et Livremore D. Carbapénémases et β-lactamase à spectre élargi chez *Klebsiella pneumoniae* isolées du Turkei avec OXA-48-like carbapénémases et autre membrane protéine. International Journal of Antimicrobial Agents 2008; 31: 524-4.
- Woffel M, Joly-Guillevin M-L et Pajot O. Le point sur les carbapénèmes. Réanimation 2006; 17: 242-250.
- Laradi K, Mamoussi M, Mendel K, Akbaria L, Hennein, H, L. Lewis JS, Weiden M, Freeman JH et Murray CK. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of Enterobacteriaceae clinical isolates in a Texas City. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2010; 66: 445-448.
- Sekki-Aveta N, Smeati F, Scheriff JM et Mounir D. Marguerite (entérobactérie) des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au CHU de Constantine (ALGERIE). Rev. Microbiol. Ind. San. Environ. 2010; 41(2): 82-98.







Annexe 5. Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases innExtended-Spectrum  $\beta$ -LactamasesProducing *Escherichia coli* in Algerian HospitalsOccurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian HospitalsAmal Ayad<sup>1</sup>, Mourad Driss<sup>1</sup>, Claire de Curzitor<sup>2</sup>, Chloé Dupont<sup>3</sup>, Alain Hartmann<sup>4</sup>, Sébastien Solanar<sup>5</sup>, Elhane Sebou<sup>6</sup>, Lucie Annoumar<sup>7</sup> and Catherine Nouer<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine de Algiers, Centre Hospitalier Universitaire de Algiers, Algiers, <sup>2</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine, <sup>3</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine, <sup>4</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine, <sup>5</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine, <sup>6</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine, <sup>7</sup> Centre National de Recherche Scientifique, Université de Constantine 1, Constantine

## OPEN ACCESS

Edited by:

Reviewed by:

Approved by:

Specialty section:

This article was submitted to

Antimicrobials, Resistance

and Therapeutics, a specialty of

Frontiers in Microbiology

Received: 27 January 2016

Accepted: 02 August 2016

Published: 12 September 2016

Citation:

Ayad A, Driss M, de Curzitor C,

Dupont C, Hartmann A, Solanar S,

Sebou E, Annoumar L and Nouer C

(2016) Occurrence of ArmA and RmtB

Aminoglycoside Resistance 16S

rRNA Methylases in Extended-

Spectrum  $\beta$ -Lactamases Producing*Escherichia coli* in AlgerianHospitals. *Front. Microbiol.* 7:1440. doi: 10.3389/fmicb.2016.01440

\*Correspondence: Catherine Nouer

catherine.nouer@univ-alger1.dz

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

September 2016 | Volume 7 | Article 1440

The aim of this study was to characterize the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producing clinical strains of *Escherichia coli* isolated between January 2009 and June 2012 from Algerian hospitals and to determine the prevalence of 16S rRNA methylases among them. Sixty-seven ESBL-producers were detected among the 239 isolates included: 52 CTX-M-15-producers, 6 CTX-M-3-producers, 5 CTX-M-14-producers, 2 CTX-M-14-producers, 2 SHV-12-producers and one TEM-167-producer. Among the 16S rRNA-producing strains, 16S rRNA methylase genes *rmtA* and *rmtB* were detected in 10 and 14 strains, respectively. *rmtA* was located on an IncI1 plasmid and *rmtB* was located either on a IncI1 plasmid or on an IncF plasmid. *rmtB*-producing isolates were genotypically related and belonged to the sequence type ST-405 whereas *rmtA*-producing isolates belonged to ST10, ST-107, and ST-117. This first description of 16S rRNA methylases among *E. coli* in Algerian hospitals pointed out the necessity to establish control measures to avoid their dissemination.

**Keywords:** *Escherichia coli*, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, 16S rRNA methylase, *rmtA*, *rmtB*, Algeria

## INTRODUCTION

The emergence of  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli* which is the most common cause of Gram-negative infections has become a significant health concern, mainly due to the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) (Toussaint and Courvalin, 2008). Indeed, CTX-M ESBLs (more than 150 enzymes) have increased significantly in international diversity, particularly

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

September 2016 | Volume 7 | Article 1440

April 2016

CTX-M, ArmA, and rmtB in *E. coli* from Algeria

in *E. coli* in most regions of the world (Cannon and Cogan, 2005). Another worrisome feature is the emergence of isolates resistant to all clinically important aminoglycosides related to the production of 16S rRNA methylases. In 2003, the first 16S rRNA methylase gene, *rmtA*, was identified (Gilliland et al., 2003). To date eleven 16S rRNA methylase genes (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *rmtI*, *rmtJ*, *rmtK*, and *rmtL*) have been identified to date. It was identified for the first time in *Enterobacteriaceae* strains isolated from an Algerian patient transferred to Belgium (Joung et al., 2007). It was subsequently identified in clinical isolates of *E. coli* from a Constantine associated with CTX-M-3 or CTX-M-15 (Nasri et al., 2009, 2011) and in clinical strains of *Salmonella enteritidis* in Algeria associated with CTX-M-15 and CMY-2 (Sourdi et al., 2011). Recently, it was also described in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens* (Sokolov et al., 2014; Ibelli et al., 2014; Ibelli et al., 2015; Khennouchi et al., 2015).

In Algeria, the first CTX-M enzymes have been reported in 2009 in clinical strains of *Salmonella enteritidis* from Constantine, east of Algeria (Nasri et al., 2009). Since then, several surveys in the north of Algeria have reported the presence of CTX-M-type enzymes such as *Enterobacteriaceae* (Ibals Ahmed Kazi Tami and Aïme, 2014). Concerning 16S rRNA methylase only ArmA has been detected to date. It was identified for the first time in *Enterobacteriaceae* strains isolated from an Algerian patient transferred to Belgium (Joung et al., 2007). It was subsequently identified in clinical isolates of *E. coli* from a Constantine associated with CTX-M-3 or CTX-M-15 (Nasri et al., 2009, 2011) and in clinical strains of *Salmonella enteritidis* in Algeria associated with CTX-M-15 and CMY-2 (Sourdi et al., 2011). Recently, it was also described in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens* (Sokolov et al., 2014; Ibelli et al., 2014; Ibelli et al., 2015; Khennouchi et al., 2015).

In this study, we have characterized the ESBL-producing clinical strains of *E. coli* isolated between October 2009 and June 2012 in three hospitals in Western Algeria and determine the prevalence of 16S rRNA methylase genes among them.

**Antimicrobial Susceptibility Testing.** Detection of ESBL production was performed by double disk synergy test (Turker et al., 1988).

**Bacterial DNA Preparation, Gene Amplification, and Sequencing**  
Bacterial DNA preparation, gene amplification, sequencing, and nucleotide sequence analyses were performed as previously described (Sokolov and Nouer, 2011). The primers used for the PCR are listed in Table 1. All the products were analyzed for the presence of *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, and *rmtE*. The resistant strains to all aminoglycosides tested were further analyzed for the presence of *rmtA* and *rmtB*.

**Genotyping of the Isolates Producing 16S rRNA Methylase**  
The strains were submitted to genotypic analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus sequence typing (MLST). PFGE was performed using DNA digested by  $\lambda$ stai as already described (Nouer et al., 1996). Restriction patterns were interpreted according to Tenover criteria (Tenover et al., 1995), and the isolates have been classified into different pulsotypes. Pulsotypes were compared by calculation of the Dice correlation coefficient with DendroBIO software and were clustered into a dendrogram by UPUMA. Strains were defined as having a clonal relationship at a criterion of 95% similarity (Spryna et al., 2000). MLST was performed using seven conserved housekeeping genes of *E. coli* (*adhA*, *glnA*, *gndA*, *hlyE*, *mdhA*, *parA*, and *rfaI*) as previously described (Tenover et al., 1995). The sequence types were determined by referring to the open-source software freely available at MLST Database at the 331, University College Cork website.

**Mating Experiments and Plasmids**  
Mating experiments to attempt to transfer resistant genes were carried out using rifampin resistant *E. coli* E12 C800 recipient strain as described previously (Chen et al., 2007). Transconjugants were selected on tetracycline agar plates containing 4 mg/ml tetracycline (4 mg/ml), gentamicin (4 mg/ml), and rifampicin (300 mg/ml), on tetracycline agar plates containing cotrimoxazole (4 mg/ml) and rifampicin (300 mg/ml) and on tetracycline agar plates containing ampicillin (30 mg/ml) and rifampicin (300 mg/ml).

Plasmid profiles of plasmids by PCR-based plasmid typing were performed on the donor and recipient strains as described previously (Carattini et al., 2005). Plasmid maps were determined by digestion of plasmid DNA with 51 endonucleases to locate the plasmid and PCR to separate them. Plasmids obtained were transferred to nylon membrane and hybridized with digoxigenin-labeled specific probes.

**Antibiotic Susceptibility Testing**  
Twenty three antibiotics (Sintalab) were tested (Table 1). Antibiotic susceptibility testing was determined by disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) of cultures was determined by a dilution method in Mueller-Hinton (MH) broth (Bio-Rad) as described by the European Committee

on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2008).

**Statistical Analysis**  
Statistical analysis was performed using the Chi-square test.

**Ethical Approval**  
The study was approved by the ethics committee of the University of Algiers.

**Author Contributions**  
AA, MD, CD, CD, AH, SS, ES, LA, and CN conceived the study. AA, MD, CD, CD, AH, SS, ES, LA, and CN participated in the design and coordination of the study. AA, MD, CD, CD, AH, SS, ES, LA, and CN performed the experiments. AA, MD, CD, CD, AH, SS, ES, LA, and CN analyzed the data. AA, MD, CD, CD, AH, SS, ES, LA, and CN wrote the paper. All authors contributed equally and significantly to writing this paper. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflict of Interest Statement**  
The authors declare that they have no conflict of interest.

**Copyright © 2016 Ayad, Driss, de Curzitor, Dupont, Hartmann, Solanar, Sebou, Annoumar and Nouer.** This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited and subject to any copyright notices concerning any material which may be reproduced or transmitted, in print or online, by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, and by any information storage and retrieval system.

**Frontiers in Microbiology** | www.frontiersin.org

September 2016 | Volume 7 | Article 1440

Annexe 6. (Lettre à l'éditeur). First Detected Human Case in Algeria of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011

## First Detected Human Case in Algeria of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate

Meryem Berrazeg,<sup>a</sup> Linda Hadjadj,<sup>a</sup> Amel Ayad,<sup>b</sup> Mourad Drissi,<sup>c</sup> Jean-Marc Rolain<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aix-Marseille Université, Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranéenne Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France; <sup>b</sup>Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques (LAPASB), Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, de la Terre, et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid—Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>c</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, de la Terre, et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid—Tlemcen, Tlemcen, Algeria

The *mcr-1* gene, a transferable plasmid-mediated colistin resistance gene, was recently detected in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and patients in China (1). This gene spread rapidly beyond China into southern Asia, Europe, South America, and Africa, mirroring the emerging NDM-1-like scenario (2–7). In Algeria, Olaitan et al. confirmed the presence of *mcr-1* in poultry (8), but to the best of our knowledge, no human case has yet been reported. In response to this potential clinical problem, we retrospectively genotyped six colistin-resistant (breakpoint for resistance, >2 µg/ml) *E. coli* isolates collected between October 2009 and December 2011 from Stidi Belabess University Hospital for the presence of the *mcr-1* gene using a previously described PCR method (1). The *mcr-1* gene was detected in one isolate (SE65). This isolate was obtained from a urine sample of an 18-year-old polytrauma man hospitalized in May 2011 with no history of traveling abroad. The characteristics of SE65 are shown in Table 1. Multilocus sequence typing (MLST) indicated that SE65 belonged to sequence type 405 (ST405), which differs from the STs identified in clinical *E. coli* isolates harboring *mcr-1* from Denmark (ST744) (2), Egypt (ST1011) (5), and Cambodia (ST354) (9). Colistin resistance was successfully transferred to the *E. coli* J53 (*F*<sup>+</sup> *mcr-1* *pro* *Azi*<sup>r</sup>) strain via a conjugation experiment. The presence of *mcr-1* in the transconjugant suggested that this gene was located on a transferable plasmid. This result confirms the finding that the *mcr-1* gene is mobilized on plasmids that have spread to different *Enterobacteriaceae* (7, 10). We notice also a small reduction of ciprofloxacin's diameter of inhibition in the transconjugant strain, but this occurs without any change in the interpretation of susceptibility testing results.

Here, we report for the first time the presence of the *mcr-1* colistin resistance gene in a clinical *E. coli* isolate from Algeria. The isolate was obtained in 2011, indicating that the existence of transmissible colistin resistance in Algerian hospitals is not a recent occurrence. The *mcr-1* gene has been present, though not detected, for a long time (11). With the extensive use of colistin in hospitals, colistin resistance has already spread worldwide (8). However, there are also reports of colistin resistance in humans who have not previously received the drug. Colistin use in animals suggests that animals may be an important source of transmission of colistin resistance to humans (12).

Surveillance of the emergence of this new gene is warranted, and the situation may be alarming, because infections due to such multidrug-resistant bacteria are associated with increased lengths of stay in intensive care units and increased mortality. Unfortunately, colistin susceptibility testing for *Enterobacteriaceae* is not a routine procedure in diagnostic laboratories. Furthermore, the disc diffusion method has been reported to be highly unreliable

TABLE 1 Characteristics of *mcr-1*-positive *E. coli* strains and an *E. coli* transconjugant by antibiotic susceptibility testing<sup>a</sup>

Antibiotic(s)	Diam of zone of inhibition (mm) of indicated strain (resistance gene(s); MIC (µg/ml) of colistin)		
	<i>E. coli</i> SE65 ( <i>mcr-1</i> bla <sub>TEM-1</sub> bla <sub>SHV-1</sub> bla <sub>CTX-M15</sub> )	Transconjugant ( <i>mcr-1</i> )	<i>E. coli</i> J53 (none)
Amoxicillin	6	6	27
Amoxicillin-clavulanate	6	9	20
Ticarcillin-clavulanate	6	11	25
Cefotaxime	6	28	28
Ceftriaxone	6	27	27
Cefepime	6	28	28
Aztreonam	9	31	31
Imipenem	31	27	27
Ertapenem	22	30	30
Gentamicin	23	25	25
Amikacin	22	28	27
Ciprofloxacin	6	26	32
Trimethoprim-sulfamethoxazole	6	6	20
Rifampin	10	9	10
Polymyxin	31	31	17
Colistin	15	16	19

<sup>a</sup> Antibiotic susceptibility testing was performed according to CLSI recommendations.

for colistin. The recommended method remains the Etest (13), but MIC values for detecting *mcr-1* colistin resistance genes are very low (≥4 µg/ml). Recently, a new SuperPolymyxin screening medium able to detect any polymyxin-resistant bacterium regardless of its level was developed. This medium may be used in human and veterinary medicine to monitor the dissemination of *mcr-1* colistin resistance (14).

### ACKNOWLEDGMENTS

We have no conflict of interest or financial interests to declare. No funding was received for this work.

Accepted manuscript posted online 20 August 2016

Charlotte Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M, Rolain JM. 2016. First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6996–6997. doi:10.1128/AAC.01157-16

Address correspondence to J.-M. Rolain, Jean-Marc.Rolain@univ-amu.fr. M.B. and L.H. contributed equally to this work. Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

### REFERENCES

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer R, et al. 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and humans beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Hassan H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen BS, Olesen B, Agerso Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas RS, Cavaco LM, Hansen DS, Aarestrup FM, Skov RL. 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 20.
- Archila MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders I, de Jong MD, Schuller C, COMBAT Consortium. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147–149. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1).
- Webb HE, Granier SA, Marash M, Müllemann Y, den Bakker HC, Nightingale KK, Bugard M, Isaac SA, Scott HM, Loneragan GH. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:144–145. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1).
- Elmhady SS, Khalifa HO, Sofman AM, Ahmed AM, Moustafa AH, Shimamoto T, Shimamoto T. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3249–3250. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02029-16>.
- Tse H, Yuen KY. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance

- gene. *Lancet Infect Dis* 16:145–146. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00532-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00532-0).
- Rolain JM, Olaitan AO. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin? *Int J Antimicrob Agents* 47:4–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.010>.
- Olaitan AO, Chabou S, Okoh L, Morand S, Rolain JM. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00540-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00540-3).
- Stoesser N, Muller AJ, Moore GE, Day NP, Cook DW. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHSHPMS plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis* 16:285–286. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00101-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00101-4).
- Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. 2016. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Lancet Infect Dis* 16:287–288. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00056-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00056-6).
- Skov RL, Monnet DL. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 21.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2016. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents* 47:1–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.009>.
- Galani I, Kontopidou F, Souli M, Bekatsina PD, Koratzani E, Deliolani I, Giannaridou H. 2008. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents* 31:434–439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011>.
- Nordmann P, Jayol A, Peiré L. 2016. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram negatives. *J Clin Microbiol* 54:1395–1399. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00446-16>.

Downloaded from http://aac.asm.org/ on March 30, 2017 by UNIV OF CALIF SAN DIEGO

Downloaded from http://aac.asm.org/ on March 30, 2017 by UNIV OF CALIF SAN DIEGO

Annexe 7. Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance *qepA1* Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Alger

MICROBIAL DRUG RESISTANCE  
Volume 10, Number 02, 2018  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/mdr.2016.0103

EPIDEMIOLOGY

Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance *qepA1* Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Algeria

Bottera Yanat,<sup>1,2</sup> Radia Dal Yahia,<sup>3</sup> Laila Yanat,<sup>3</sup> Jesús Machado,<sup>2,4,5</sup> Paula Díaz De Alajuela,<sup>5</sup> Abdelaziz Touati,<sup>1</sup> Alvaro Pascual,<sup>2,4,5</sup> and José-Manuel Rodríguez-Martínez<sup>2,4</sup>

*QepA* is a plasmid-mediated quinolone resistance determinant of low prevalence described worldwide, mainly in *Enterobacteriaceae*. This study describes, for the first time in Algeria, two clonally related, *QepA*-producing *Escherichia coli* clinical isolates positive for CTX-M-15. The clonal spread of these multidrug-resistant isolates is a major public health concern.

**Keywords:** *E. coli*, clinical, *QepA*, Algeria

Introduction

A PART FROM CHROMOSOMAL mutations in the genes encoding DNA gyrase and Topoisomerase IV (mainly *gyrA* and *gyrB*) and mutations leading to decreased permeability or overexpression of efflux pumps in quinolone resistance, plasmid-encoded resistance emerged in the 2000s, with three mechanisms known so far: *Qnr* peptides (*QnrA*, *QnrB*, *QnrC*, *QnrD*, *QnrE*, and *QnrX*), the aminoglycoside acetyltransferase variant AAC(6)-Ib-cr, and *QepA* and *QepB* efflux pumps.<sup>1</sup> The *QepA* determinant was first discovered in 2007 in two *Escherichia coli* clinical isolates from Japan<sup>2</sup> and Belgium.<sup>3</sup> This is a plasmid-mediated efflux pump in the major family that confers resistance to quinolones and other antimicrobials. After the initial discovery, a variant of *qepA* possessing two amino acid substitutions has been identified and named *QepA2*.<sup>4</sup> Wang *et al.* recently identified a new *qepA* allele, *qepA1*, in China.<sup>5</sup>

level fluoroquinolone resistance in the university hospital center of Oran (northwest Algeria). The genetic environment of *qepA1* is also characterized.

Materials and Methods

Forty-nine *E. coli* isolates non-susceptible to ciprofloxacin were collected at the university hospital of Oran (Algeria) in 2011 and studied. The isolates were recovered from various clinical samples (urine [*n* = 23], pus [*n* = 12], blood cultures [*n* = 8], sputum [*n* = 2], bronchial [*n* = 2], ocular discharge [*n* = 1], pleural fluid [*n* = 1], and coaral fluid [*n* = 1]) and identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF Biotyper 3.1; Microflex BULKER, Madrid, Spain). Antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar plates; minimum inhibitory concentrations (MICs) of fluoroquinolones were determined by the microdilution method. The results were interpreted according to CLSI guidelines.<sup>6</sup>

Screening for plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *B*, *C*, *D*), *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, and *qepB* was carried out by PCR using specific primers, described previously.<sup>7</sup> Mutations in *gyrA* and *parC* genes were analyzed by amplification and sequencing of the quinolone resistance-determining region (QRDR).<sup>8</sup>

Detection of beta-lactamases was by the double-disk synergy test (DDST)<sup>9</sup> on Mueller-Hinton agar with and without cefoxitin.<sup>10</sup> Simplex PCR was used for the detection of *MdrC*,<sup>11</sup> *MdrA*,<sup>12</sup> *MdrB*,<sup>13</sup> and *MdrX* genes<sup>14</sup> and

2

YANAT ET AL.



FIG. 1. Dendrogram of patterns generated by pulsed-field gel electrophoresis of *qepA1*-positive *Escherichia coli* isolates. PMQR,  $\beta$ -lactam-mediated quinolone resistance.

multiple PCR for *ampC* genes.<sup>15</sup> The presence of the *rmlB* gene was determined by PCR, as previously described.<sup>16</sup> All amplicons were sequenced.

Conjugation experiments were performed in liquid culture media. Transconjugants were selected on Tryptone Soy (TS) agar plates containing sodium azide (150 mg/L) and ciprofloxacin (0.03 mg/L). Transformation experiments were performed by electroporation, and recombinant strains were selected onto ciprofloxacin-containing (0.03 mg/L) TS agar plates. Acido-resistant *E. coli* J53 and streptomycin-resistant *E. coli* DH10B were used as recipient strains for conjugation and transformation assays, respectively.

To determine the clonal relationship of *qepA1*-positive *E. coli* isolates, multiplexed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed using a  $\lambda$ -CHEF-DR1 system (Bio-Rad, Hercules, CA, United Kingdom) ([www.pulsedfieldinternational.org/protocols/pfge.asp](http://www.pulsedfieldinternational.org/protocols/pfge.asp)). The genetic structures surrounding the *qepA1* gene in the *E. coli* isolates were cloned by restricting total DNA with *Xba*I for the O59 isolate and with *Xba*I for the O80 isolate overnight at 37°C, then ligated into the pUC-CMV vector, and the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH10B by electroporation. Recombinant plasmids were selected onto TS agar plates containing ciprofloxacin (0.03 mg/L) and kanamycin (30 mg/L), and the recombinant plasmid DNA was extracted with a Qiafilter Plasmid Mini Kit (Qiagen). Primer walking was performed to identify the genetic structures surrounding the *qepA1* gene using universal primers T3 and T7 (Macrogen Europe Laboratory, the Netherlands).

Results

Among 49 *E. coli* clinical isolates analyzed, 20 (41%) were positive for at least 1 PMQR gene, including *qnrS*-like (*n* = 1), *aac(6)-Ib-cr* (*n* = 16), *aac(6)-Ib-cr + qepA1*-like (*n* = 1), *qepA1* (*n* = 1), and *qepA1 + qnrS*-like (*n* = 1). To

the best of our knowledge, this is the first report of the occurrence of *qepA1* gene in isolates from Algeria. This study focuses on two *qepA1*-positive *E. coli* isolates, O59 and O80, recovered from the urine of 45- and 60-year-old female patients who were hospitalized in nephrology and surgical intensive care unit services, respectively. These multidrug-resistant isolates harbored *MdrC*,<sup>11</sup> *MdrA*,<sup>12</sup> *MdrB*,<sup>13</sup> and *rmlB* genes (Fig. 1). They were resistant to cefotaxime, with no increase in susceptibility on Mueller-Hinton agar with cloxacillin in the DDST, and were negative for plasmid-mediated *AmpC* genes tested by PCR, suggesting chromosomal cephalosporinase production. The QRDR sequences of *gyrA* and *parC* showed that the *qepA1*-positive *E. coli* isolates carried two substitutions in *gyrA* (Ser382Leu and Asp378Asn) and one substitution in *parC* (Ser80Ile) with a high MIC of ciprofloxacin of >256 mg/L. Cluster analysis of the PFGE image of restriction fragments revealed high genetic similarity (95%) between *qepA1*-positive *E. coli* isolates, showing clonal relatedness. These *qepA1* genes were not transferable by conjugation or transformation, despite several attempts. Ciprofloxacin MIC values for clones obtained from the *E. coli* DH10B recipient were increased by at least 60-fold (Table 1). Sequence analysis revealed that the IS26 element followed by a truncated *intI1* and *qep2* gene (class 1 integron-*intI1*-*qep2* and *intI1*-*qep2* resistance genes, respectively) was located upstream of the *qepA1* gene. Downstream, this gene was associated with the ISCR1-like element.

Discussion

In this study, the *QepA* efflux pump was reported for the first time in Algeria in two (4% prevalence) clinical *E. coli* strains from 2011. This PMQR determinant has been described worldwide with low prevalence in humans, animals, and the environment in *E. coli* isolates<sup>17</sup> and has been associated with other PMQR determinants or antibiotic markers, such as *MdrA*,

Isolate/clone <sup>a</sup>	PMQR gene	MICs CIP (mg/L)	Resistance patterns	Other antibiotic markers
O59	<i>qepA1</i> / <i>qepB</i>	>256	CN-TOB-AK-TE-SXT-AML-FOX-CITX-CAZ-ATM-FEP	CTX-M-15, TEM-1, RmlB
Cl O59	<i>qepA</i>	0.12	CN-TOB-AK-SXT-AML-CTX-CAZ-ATM-FEP	CTX-M-15, TEM-1, RmlB
O80	<i>qepA</i>	>256	CN-TOB-AK-TE-SXT-AML-FOX-CITX-CAZ-ATM-FEP	CTX-M-15, TEM-1, RmlB
			3 AML	TEM-1, RmlB

C, gentamicin; CTX, cefotaxime; FEP, ceftazidime; FOX, TE, tetracycline; TOB, tobramycin.

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana, FSNY, Universidad de Burgos, Burgos, Spain.  
<sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Seville, Seville, Spain.  
<sup>3</sup>Servicio de Bacteriología, Edificio Hospitalario de Universidad de Oran, Universidad de Oran Facultad de Medicina, Oran, Algeria.  
<sup>4</sup>Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REPI RD120015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.  
<sup>5</sup>Unidad Interdisciplinaria de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Spain.

FIRST REPORT OF QEP A GENE IN ALGERIA

*MdrC*,<sup>11</sup> and *rmlB*. In this study, *qepA1* gene was found in TEM-1- and CTX-M-15-producing *E. coli* isolates; these isolates and their clones were also resistant to aminoglycosides with the presence of the *rmlB* gene. Isolation of these isolates in ST313 clone was detected by D25B allele characterization (data not shown). Previous studies have confirmed that the spread of *rmlB* and *qepA1* is mainly mediated by similar P2A-C-H- plasmids.<sup>18</sup> The presence of the *qepA1* gene is very rare in human samples.<sup>17</sup> In our report, the two *qepA1*-positive *E. coli* isolates, which were isolated in different services of the same hospital in the same year but at an interval of 1 month, were found to be clonally related. The genetic structures surrounding the *qepA1* gene revealed that this determinant was flanked by IS26 and ISCR1 elements associated with the *MdrA*,<sup>12</sup> gene, previously described by Yamane *et al.*<sup>3</sup> and Penchón *et al.*<sup>5</sup> in 2007. Wang *et al.*,<sup>5</sup> however, reported that the *qepA1*-positive isolates also contained either *MdrA*,<sup>12</sup> or *MdrB*,<sup>13</sup> genes, rather than the *MdrA*,<sup>12</sup> gene.

The *qepA1* gene is described for the first time in two clonally related ESBL-positive *E. coli* clinical isolates from Algeria. The clonal spread of these multidrug-resistant isolates is a major public health concern.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (projects PI11-00934, PI1400940), and the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (PI1-CTS-7730), Spain, and also by the Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REPI RD120015), cofinanced by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF. Bottera Yanat was supported by a PhD PNE grant from the Ministry of Higher Education and Research of Algeria.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Jacoby, G.A., J. Stubbels, and D.C. Hooper. 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol. Spectr.* 2:1–41.
- Yamane, K., I. Wachiyo, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Kanda, and Y. Arakawa. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3354–3360.
- Penchón, B., P. Courvalin, and M. Galmann. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by theylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *QepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2464–2469.
- Cattar, V., L. Poirel, and P. Nordmann. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump *QepA2* in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3801–3804.
- Wang, D., X. Huang, J. Chen, Y. Mou, H. Li, and L. Yang. 2015. Characterization of genetic structures of the *qepA3*

- gene in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol.* 6:1147.
- Hassan, W.M., A. Hashim, and R.A.A. Doman. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qepA* in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. *Indian J. Med. Microbiol.* 50:442–447.
- Agudón, A., N. Leizaola, Z. Ouchermou, S. Klemmli, D. Saita, A. Soto, J.P. Lavigne, and A. Passet. 2016. Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Bull. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35:227–234.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA.
- Rodríguez-Martínez, J.M., M.E. Cano, C. Velasco, L. Martínez-Martínez, and A. Pascual. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* 17: 149–182.
- Rodríguez-Martínez, J.M., C. Velasco, A. Pascual, I. García and L. Martínez-Martínez. 2006. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qepA*-containing plasmids. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:440–445.
- Jellies, V., M.H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippou. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:875–878.
- Rupp, E., P. Bilet, C. Verdet, G. Adet, and E. Biengen. 2006. First detection of the Ambler class C1 *AmpC-β* lactamases in *Citrobacter freundii* by a new, simple Double-Disk Synergy test. *J. Clin. Microbiol.* 44:4204–4207.
- Dax, M.A., J.R. Hernández-Bello, I. Rodríguez-Baño, L. Martínez-Martínez, J. Calvo, J. Blanco, and A. Pascual. 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 48:2840–2845.
- Ries-Pérez, F.J., and N.D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated *AmpC* lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2153–2162.
- Dax, Y., and Y. Anikawa. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 45:88–94.
- Chen, X., W. Zhang, W. Fan, J. Yin, Z. Pan, S. Guo, and X. Fan. 2012. Persistence of *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, and *qepB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 3423–3427.
- Kim, E.S., J.Y. Jeong, S.H. Choi, S.O. Lee, S.H. Kim, M.N. Kim, J.H. Woo, and Y.S. Kim. 2009. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:335–338.

Address correspondence to:  
José-Manuel Rodríguez-Martínez, PhD  
Department of Microbiology  
University of Seville  
Avda Sánchez Pizjuán s/n  
Sevilla 41009  
Spain  
E-mail: jmrdriguez@us.es

