

*République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique*

*Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie
et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie*

Thèse de Doctorat

*Pour l'obtention du
Grade de Docteur en Sciences*

Présentée par: Mme LAGHA NOURIA Ep BENMESMOUDI

Thème:

« Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat »

Devant le jury composé de :

<i>Pr Moussa Boudjemaa Boumediène</i>	<i>Président du jury</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
<i>Pr Touati Abdelaziz</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université de Bejaia</i>
<i>Dr Idoui Tayeb</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université de Jijel</i>
<i>Dr Boutaiba Saad</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université de Djelfa</i>
<i>Pr Abdelouahid Djamel Addine</i>	<i>Directeur de Thèse</i>	<i>Université de Tlemcen</i>
<i>Pr Hassaine Hafida</i>	<i>Co-directrice de Thèse</i>	<i>Université de Tlemcen</i>

Année Universitaire : 2014 – 2015.

Dédicaces

Je dédie cette thèse,

A tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, Pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma Vie, leur confiance en moi, leur encouragements, et leur amour.

A mon époux, pour son affection, les sacrifices consentis tout au long de ce travail et pour son soutien sans faille.

A mes enfants, qui m'ont donnée un sens à ma vie, que ce travail soit pour vous un exemple à suivre.

A mes frères et sœurs, pour leur support continuel et leur amour.

A l'ensemble de la famille LAGHA.

Et à toutes mes amies.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de deux laboratoires : Laboratoire de « Microbiologie », Hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie ; et Laboratoire de « Bactériologie-Mycologie-Parasitologie », Hôpital Gabriel-Montpied, Clermont- Ferrand, France.

Mes remerciements s'adressent d'abord, à mon directeur de thèse, le professeur Abdelouahid Djamel Addine. Je le remercie pour son encadrement, pour ses encouragements et pour sa rigueur scientifique au quotidien durant ces années.

Je remercie chaleureusement, ma co-directrice de thèse, Madame le professeur Hassaine Hafida pour ses précieux conseils, son soutien, son oreille attentive, sa gentillesse, son dynamisme et son amitié. Merci de m'avoir fait confiance et m'a encouragé pour la réalisation de ce projet de recherche.

C'est avec un grand plaisir que je remercie le professeur Moussa Boudjemaa Boumediène, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse, que ce travail constitue le témoignage de notre respect.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Bonnet Richard, chef service de Laboratoire de « Bactériologie-Mycologie-Parasitologie », Hôpital Gabriel-Montpied, Clermont- Ferrand, France ; de m'avoir accueillie dans son laboratoire et a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la recherche. Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses obligations et ses responsabilités. Merci pour sa collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je tiens aussi à exprimer mes plus profonds remerciements au Professeur Touati Abdelaziz, d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et pour l'aide qu'il m'a fourni au cours de la rédaction de l'article et de cette thèse. Je le remercie pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens également à exprimer mes plus profonds remerciements au Docteur Idoui Tayeb, pour sa disponibilité, et pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je remercie cordialement le Docteur Boutaïba Saad, pour sa disponibilité, et de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury et examiner ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements au Docteur Robin Frédéric, de m'avoir guidé et orienté dans l'interprétation des résultats de cette étude, pour sa disponibilité sans limite et pour ses précieux conseils. Je voudrais aussi le remercier pour les corrections qui m'ont permis d'aboutir à la rédaction des articles.

Je voudrais désormais remercier Mme Benmakhlouf Lilia, chef service du laboratoire de Microbiologie, Laghouat ; pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour ses discussions scientifiques et son ouverture d'esprit. Je la remercie pour sa confiance, son soutien, ses encouragements, et son affection. Merci pour les petites pauses café et les bons moments passés ensemble durant cette étude.

Mes vifs remerciements s'adressent également au Monsieur Guillouard Laurent, pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de différentes manipulations de la biologie moléculaire. Je remercie aussi madame Marlène, madame Morge et Hanh pour leur sympathie et leur accueil.

Je souhaite remercier aussi tous les médecins, les infirmières et les aides soignants, de l'Hôpital de Laghouat, pour leur sympathie, leur disponibilité, mais surtout pour m'avoir facilité le recueil des souches bactériennes. Merci aussi, à l'ensemble des techniciens du laboratoire de « Microbiologie », pour leur accueil, leur assistance, leur aimable et efficace collaboration.

Je remercie aussi tous mes collègues, enseignants et responsables, ainsi que les personnels administratifs de l'université Amar Telidji.

Merci enfin à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ma thèse.

Table des matières

	Page
Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Résumé.....	v
Introduction générale	1
Première partie : Synthèse bibliographique	
I. Les entérobactéries	4
1- <i>Escherichia coli</i>	4
2- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
3- <i>Enterobacter cloacae</i>	5
4- <i>Citrobacter freundii</i>	6
II. Les β -lactamines.....	7
1- Généralités.....	7
2- Structure.....	7
3- Mode d'action des β -lactamines.....	7
4- Familles de β -lactamines.....	8
4- 1- Les pénicillines.....	9
4- 2- Les céphalosporines.....	9
4- 3- Les carbapénèmes.....	10
4- 4- Les monobactames.....	10
III. Résistance aux β -lactamines.....	10
1- Notion de la résistance bactérienne.....	10
2- Types de résistance.....	10
2-1- Résistance naturelle.....	10
2-2- Résistance acquise.....	11
3- Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	12
3-1- Diminution de la perméabilité.....	12
3-2- Hyperproduction de système d'efflux.....	13
3-3- Modification des PLP.....	13
3-4- Production de B-lactamases.....	14

3-4-1- Définition des β -lactamases.....	14
3-4-2- Mode d'action.....	14
3-4-3- Classification.....	15
3-4-3-1- Les β -lactamases de classe A.....	15
3-4-3-2- Les β -lactamases de classe β	16
3-4-3-3- Les β -lactamases de classe C.....	16
3-4-3-4- Les β -lactamases de classe D.....	17
4- Les céphalosporinases plasmidiques.....	17
IV. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	18
1- Définition.....	18
2- Différents types des BLSE	19
2-1- BLSE de type TEM.....	19
2-2- BLSE de type SHV	20
2-3- BLSE de type CTX-M	21
2-4- Autres types de BLSE.....	22
3- Facteurs de risque.....	22
Deuxième partie : Matériel et méthodes	
1- Présentation de l'hôpital de Laghouat.....	24
2- Patients et prélèvements.....	24
3- Ensemencement.....	24
4- Isolement et purification.....	25
5- Identification de souches.....	25
6- Sensibilité aux antibiotiques.....	26
7- Tests de détection de BLSE.....	27
7-1- Test de synergie.....	27
7-2- Test du double disque.....	28
7-3- Test à la cloxacilline.....	29
8- Extraction enzymatiques de β -lactamases.....	29
9- Isoélectrofocalisation (IEF).....	30
10- Extraction d'ADN total.....	30
11- Caractérisation de β -lactamases par PCR.....	31
12- Séquençage.....	32
13- Typage moléculaire par ERIC-PCR.....	32

14- Transfert génétique par conjugaison.....	33
15- Extraction de l'ADN plasmidique.....	35
16- Electrophorèse d'ADN plasmidique.....	35
Troisième partie : Résultats et discussion	
I. Résultats	37
1- Souches bactériennes.....	37
1-1- Fréquence des EBLSE.....	37
1-2- Répartition des EBLSE selon l'espèce par année.....	38
1-3- Répartition des EBLSE selon la nature des prélèvements.....	38
1-4- Répartition des EBLSE en fonction des services.....	39
2- Caractéristiques des patients.....	40
3- Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	40
3-1- Sensibilité aux β -lactamines.....	41
3-2- Sensibilité aux aminosides	42
3-3- Sensibilité aux quinolones	43
3-4- Sensibilité aux autres antibiotiques	44
4- Focalisation isoélectrique	45
5- Caractérisation de BLSE.....	46
5-1- BLSE de type CTX-M	46
5-2- BLSE de type SHV.....	47
5-3- BLSE de type TEM	47
6- Caractérisation des Céphalosporinases plasmidiques.....	48
7- Typage moléculaire.....	48
7-1- <i>Escherichia coli</i>	49
7-2- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
7-3- <i>Enterobacter cloacae</i> et <i>Citrobacter freundii</i>	50
8- Conjugaison	51
9- Analyse du profil plasmidique	51
II. Discussion.....	55
Conclusion générale et perspectives	62
Références bibliographiques.....	64
Annexes.....	80

Liste des figures

	Page
Figure N°1 : Structures de quelques β -lactamines.....	8
Figure N°2 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame.....	14
Figure N°3 : Les BLSE dérivées de TEM.....	19
Figure N°4 : Les BLSE dérivées de SHV.....	20
Figure N°5 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.....	29
Figure N°6 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque.....	30
Figure N°7 : Répartition de l'ensemble des entérobactéries productrices de BLSE.....	38
Figure N°8 : Répartition de souches EBLSE selon la nature des prélèvements.....	40
Figure N°9 : Répartition de souches EBLSE selon le service d'origine.....	40
Figure N°10 : Image de synergie chez une souche de <i>K. pneumoniae</i>	41
Figure N°11 : Sensibilité aux β -lactamines des entérobactéries productrices de BLSE.....	43
Figure N°12 : Sensibilité aux aminosides des entérobactéries productrices de BLSE.....	44
Figure N°13 : Sensibilité aux quinolones des entérobactéries productrices de BLSE.....	45
Figure N°14 : Sensibilité aux autres antibiotiques testés de souches entérobactéries productrices de BLSE.....	46
Figure N°15 : Résultat de l'isoélectrofocalisation de neuf souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices de BLSE.....	47
Figure N°16 : Amplification par PCR de β -lactamases CTX-M-15.....	48
Figure N°17 : Amplification par PCR de β -lactamases SHV, TEM et DHA.....	49
Figure N°18 : Typage moléculaire par ERIC-PCR de 13 souches d' <i>E. coli</i>	50
Figure N°19 : Typage moléculaire par ERIC-PCR de souches <i>K. pneumoniae</i> (à gauche), et <i>E. cloacae</i> et <i>C. freundii</i> (à droite).....	51
Figure N°20 : Analyse de contenu plasmidique de 12 souches cliniques.....	53

Liste des tableaux

	Page
Tableau N°1 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les Entérobactéries.....	27
Tableau N°2 : Amorces utilisés pour les PCR et séquençages.....	33
Tableau N°3 : Répartition des espèces d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) par année d'étude.....	39
Tableau N°4 : Caractéristiques générales et moléculaires de souches cliniques d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu isolées à l'hôpital de Laghouat.....	54

Liste des abréviations :

ATB: Antibiotique.

BET: Bromure d'éthidium.

BCC : Bouillon cœur cerveau.

BLSE: β -lactamase à spectre étendu.

C°: degré Celsius.

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération.

Cf : *Citrobacter freundii*.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CTX-M : Céfotaximase-Munich.

DHA : Dharhan hospital.

Ec: *Escherichia coli* .

EBLSE: Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu.

EDTA : Ethylenediamin tetraacetic acid.

En: *Enterobacter cloacae*.

ERIC: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus.

h : heure.

g : gramme.

kb : kilobase.

Kp: *Klebsiella pneumoniae*.

M : molaire.

MH : Muller – Hinton .

ml : millilitre.

mm : millimètre .

min : minute.

μ g : microgramme.

μ l : microlitre.

pb : paire de bases.

pI : Point isoélectrique.

PM : Poids moléculaire.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

SDS : Sodium dodécyl sulfate.

SHV : Sulfhydryl variable.

TAE : Tris Acétate EDTA.

TBE : Tris-Borate-EDTA.

TC : Transconjugant.

TE : Tris-EDTA.

TEM : Temoneira.

Trs : Tours.

Résumé

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), notamment avec l'émergence récente ces dernières années, de nouveaux types de BLSE, dits CTX-M. Ces entérobactéries productrices de CTX-M sont responsables d'infections nosocomiales dans les hôpitaux et maintenant communautaires. Jusqu'à maintenant, aucune donnée n'est disponible pour permettre de connaître la situation actuelle sur les différents types de BLSE produits par les entérobactéries, dans l'hôpital de Laghouat.

Le but de cette étude était de caractériser le type de BLSE, la prévalence, et de rechercher une possible dissémination clonale des souches cliniques d'entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre élargi (EBLSE), isolées entre 2010 – 2012, chez les patients hospitalisés à l'hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie

Au total, quatre-cent cinq souches d'entérobactéries ont été isolées chez 748 patients. Trente souches (7.4 %) ont été productrices de BLSE, répartie comme cela : 13 *Escherichia coli*, 9 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Enterobacter cloacae*, et 2 *Citrobacter freundii*. Excepté pour l'imipénème, la sensibilité aux antibiotiques testés montre une résistance totale à la majorité des céphalosporines de 3^{ème} génération, ainsi qu'une résistance très fréquente aux Aminosides et Fluoroquinolones.

Les β -lactamases de type CTX-M-15 étaient prédominantes (97 %), suivi de TEM-4 (10 %) et de SHV-12 (3 %). La céphalosporinase de type DHA-1 était retrouvé chez trois souches de *K. pneumoniae* en association avec CTX-M-15. Le typage moléculaire par ERIC-PCR a montré que les souches étaient génétiquement différentes. Les expériences de conjugaison ont montrés que le gène *bla*_{CTX-M-15} était porté par un plasmide conjugatif de grand poids moléculaire (>85 kb).

Notre étude a révélé la diffusion de BLSE de type CTX-M, en particulier CTX-M-15, et de céphalosporinases plasmidiques DHA-1 dans notre établissement qui expose à un problème croissant de prise en charge thérapeutique. Il s'agit d'un premier rapport réalisé à Laghouat.

Mots clés : Entérobactéries, Résistance aux antibiotiques, Epidémiologie, BLSE, DHA-1.

Abstract

The antibiotic resistance of enterobacteriaceae knows a worldwide worrying evolution with an increase of the extended spectrum betalactamases (ESBL), especially with the emergence in recent years of a new type of ESBL: CTX-M. These CTX-M type producing Enterobacteriaceae are responsible for both nosocomial in hospital and, more recently, community infections. Up to now, no publications describe this problem, to different type of ESBL-producing enterobacteria, in Hospital Laghouat.

The aim of this study was to characterize the ESBL, the prevalence, and to seek a possible clonal dissemination of expanded spectrum β -lactamase producing enterobacteria clinical strains (E-ESBL), isolated from 2010 to 2012, at hospitalized patients of "Ahemida Ben Adjila" hospital, Laghouat, Algeria,

A total, four hundred five enterobacteria were isolated from the clinical samples of 748 patients. Thirty (7.4 %) isolates were found to produce ESBLs, distributed as follows: 13 *Escherichia coli*, 9 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Enterobacter cloacae*, and 2 *Citrobacter freundii*. Except for Imipenem, Antibiotic susceptibility testing showed a complete resistance to the majority of third-generation cephalosporins and a very frequent to Aminoglycosides and Fluoroquinolones resistance.

The β -lactamase CTX-M-15 types were predominant (97%), followed by TEM-4 (10 %), and SHV-12 (3 %). DHA-1 type cephalosporinase was found in four *K. pneumoniae* associated with CTX-M-15. ERIC-PCR analysis showed that the isolates are genetically unrelated. Conjugation experiments showed that *bla*_{CTX-M-15} was carried by conjugative plasmid of high molecular weight (>85 kb).

Our study revealed the dissemination of CTX-M type ESBL, mainly CTX-M 15, and DHA-1 type cephalosporinase in our hospital is impairing both therapeutic and health care. This is a first report made to the Hospital of Laghouat.

Keywords: Enterobacteriaceae, Resistance to antibiotics, Epidemiology, ESBL, DHA-1.

ملخص

مقاومة البكتيريا المعوية للمضادات الحيوية تعرف تطور كبير بالعالم مثير للقلق مع تزايد تأثير لل- β -لكتماز دو المدى الواسع (BLSE), خاصة مع انتشاره في السنوات الأخيرة, لأنواع جديدة من BLSE, تسمى CTX-M. هذه البكتيريا المعوية المنتجة ل-CTX-M هي مسؤولة عن عدوى المرضى في المستشفيات و الآن وسط المجتمع. حتى الآن, لا توجد أية بيانات تسمح لنا لمعرفة الوضع الحالي على وجود الأنواع المختلفة من BLSE التي تنتجها البكتيريا المعوية, داخل مستشفى الأغواط .

الغرض من هذه الدراسة هو لمعرفة نوع ال- β -لكتماز BLSE, نسبته, والبحث عن إمكانية وجود انتشار نسيلي للسلاسل السريرية المعوية المنتجة لل- β -لكتماز دو المدى الواسع (BLSE), المعزولة في الفترة ما بين 2010-2012, من المرضى المصابين بمستشفى " أحمد بن عجيبة " بالأغواط, الجزائر.

بالإجمال, تم عزل أربع مائة و خمسة من سلالات البكتيريا المعوية من 748 مريض. من بينها, ثلاثين سلالة (7.4%) كانت منتجة لل- β -لكتماز BLSE, متوزعة كالتالي: 13 الإشريكية القولونية, 9 الكلبسيلا الرئوية, 6 الأمعائية المذرقية, و 2 الليمونية الصديقة. باستثناء الإمينام, أظهرت دراسة الحساسية للمضادات الحيوية مستوى عالي جدا من المقاومة لغالبية السيفالوسبورين الجيل الثالث, متبوعة بمقاومة للأمينوغليكوزيدات والفلوروكينولونات .

ال- β -لكتماز نوع CTX-M-15 كانت هي الأكثر انتشارا (97%), تليها TEM-4 (10%) و SHV-12 (3%). أيضا, تم العثور على نوع من السيفالوسبوريناز DHA-1 عند ثلاث سلالات الكلبسيلا الرئوية الحاملة ل-CTX-M-15. أظهرت دراسة النسيلي بواسطة ERIC-PCR أن السلالات كانت مختلفة وراثيا. وقد أظهرت تجارب الأقران أن الجين $bla_{CTX-M-15}$ كانت محمولة بواسطة بلازميدات اقترانية دو وزن جزيئي عالي (<85 kb).

كشفت دراستنا انتشار لل- β -لكتماز BLSE نوع CTX-M-15, و السيفالوسبوريناز DHA-1 داخل مستشفىنا, الأمر الذي يبين لنا وجود مشكلة متنامية في انتقاء العلاج المناسب. هذا التقرير هو الأول الذي يقام بالأغواط .

كلمات مفتاحية : البكتيريا المعوية, مقاومة المضادات الحيوية, علم الأوبئة, BLSE, DHA-1 .

Introduction générale

Depuis leur découverte en 1928 par Alexander Fleming et dès leur utilisation durant la seconde guerre mondiale, les antibiotiques de la famille des β -lactamines ont été confrontés à l'émergence de la résistance. Celle-ci apparut rapidement, dès 1942, avec la première souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline.

Cependant, La résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) est en perpétuelle évolution. Cette résistance bactérienne est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part. Elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale. Les bactéries pour faire face à la pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisent des parades leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement (Ben redjeb et al. 2000).

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

Les infections causées par les souches productrices de BLSE sont associées à une morbidité et une mortalité élevées, à une prolongation de la durée de l'hospitalisation et à une augmentation des coûts d'hospitalisation (Masterton et al. 2003 ; Patterson. 2001).

Jusque dans les années 2000, la diffusion des entérobactéries productrices de BLSE concernait essentiellement le milieu hospitalier, de nombreuses épidémies hospitalières en réanimation ou en hospitalisation de longs séjours ayant été décrites (Arlet et al. 1990 ; Lucet et al. 1999). Mais aujourd'hui, la diffusion à grande échelle dans le domaine communautaire de ce type de résistance laisse augurer un problème majeur de santé publique (Pitout et al. 2005).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été décrites pour la première fois en 1983 (Kliebe et al. 1985), et sont des enzymes plasmidiques, appartenant à la classe A de Ambler, qui confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération et à au moins une céphalosporine de 3/4^{ème} génération (C3/4G) ou à l'aztréonam (Robin et al. 2012).

Actuellement, la prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (Perez et al. 2007).

Les gènes CTX-M, naturellement à médiation chromosomique chez les espèces d'entérobactéries du genre *Kluyvera* (*K. ascorbata*, *K. cryocrescens*, *K. georgiana*), transmis aux entérobactéries par un plasmide, s'expriment alors fortement chez ces dernières. Le plasmide, facilement transmissible par conjugaison *in vitro* entre entérobactéries, est l'élément incontournable à l'émergence de BLSE de type CTX-M (Bonnet. 2004). Cette propriété explique la dissémination facile des enzymes de type CTX-M dont l'importance augmente par rapport aux autres types de BLSE, notamment TEM et SHV (Arpin et al. 2007).

Par ailleurs, La résistance aux céphalosporines de troisième génération n'est plus uniquement liée aux β -lactamases de classe A chez *Klebsiella pneumoniae*, il s'agit aussi le phénotype céphalosporinase de haut niveau qui est associé à l'acquisition d'un gène plasmidique (AmpC) (Hanson. 2003), cette résistance a été décrite pour la première fois avec MIR-1 en 1988 (Papanicolaou et al. 1990).

Généralement, ces enzymes sont des céphalosporinases plasmidiques de type AmpC, classé dans le groupe 1 de Bush (classe C de Ambler), sont en général fortement exprimées et confèrent des résistances à la majorité des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (Philippon et al. 2002).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la résistance aux β -lactamines, des souches cliniques d'entérobactéries d'isolement courant dans hôpital, compte tenu aussi du fait que ces antibiotiques sont très fréquemment prescrits pour le traitement des infections dues à ces bactéries en absence d'antibiogramme.

En effet, beaucoup d'études ont déjà été rapportées au Nord d'Algérie, sur la présence de β -lactamases CTX-M-3 et CTX-M-15 : en Tlemcen, Oran, Alger, Béjaïa, Tizi-Ouzou, Sétif, Constantine et Annaba (Gharout-Sait et al. 2012 ; Iabadene et al. 2008 ; Iabadene et al. 2009 ; Meradi et al. 2011; Messai et al. 2008 ; Naas et al. 2005 ; Ramdani-Bougoussa et al. 2006). Mais malheureusement, aucune étude n'a été consacrée aux entérobactéries productrices de BLSE émergents à l'hôpital de Laghouat, ni sur l'écologie microbienne, ni sur l'état globale de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

De ce fait, les objectifs de cette étude étaient de déterminer la fréquence de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et des résistances associées aux sein de l'espèce, caractérisation de β -lactamases qui se produisent et de mettre en évidence le degré de diversité génétique par le typage moléculaire des souches d'entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) isolées des patients hospitalisés à l'Hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie.

Nous nous sommes proposé de présenter cette thèse en trois parties :

Une 1^{ère} Partie, est consacrée à un bref rappel sur les entérobactéries et les différents types d'infections qu'elles génèrent, ainsi que leurs mécanismes de résistance aux β -lactamines, avant de définir plus précisément les BLSE.

La 2^{ème} partie, décrit le matériel et méthodes pour l'analyse détaillée de nos souches cliniques isolées des patients hospitalisés aux différents services de l'hôpital de Laghouat.

Enfin, la 3^{ème} partie, notre travail est réservé à la présentation et discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Première Partie :
Synthèse Bibliographique

I. Les entérobactéries :

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries Gram-négatif qui est fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces, Mobiles par ciliature péritriche ou immobiles.

Une de leurs caractéristiques est de réduire les nitrates en nitrites, et d'acidifier le glucose par voie fermentative avec souvent la production de gaz (Avril et al. 2000).

Les germes de cette famille sont en majorité pathogènes du tube digestif humain et d'autres sont des colonisateurs normaux de ce tube digestif (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*), bien qu'ils soient également présents dans l'environnement.

Dans le cadre de notre étude, les entérobactéries incriminées sont : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*. Pour cela, il semble nécessaire de rappeler brièvement quelques caractéristiques générales de ces bactéries et les types d'infections qu'elles génèrent.

1- *Escherichia coli* :

Escherichia coli, isolée par Escherich en 1885, est l'espèce type du genre *Escherichia* qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. C'est un Bacille à Gram négatif, assez grand ($1-1.5 \times 2-6 \mu\text{m}$), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose (Farmer et al. 2007).

Les principaux caractères distincts de *E. coli* vis à vis les autres entérobactéries sont : la fermentation du lactose, la production d'une β -galactosidase, la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'uréase et l'absence d'utilisation du citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone.

Concernant l'habitat, on trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement : eau, sols, et dans les aliments (Baraduc et al. 2000).

Chez l'homme, la colonisation par *E. coli* est précoce, et peut être responsable d'un nombre varié de pathologie. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par de souches *E. coli* pathogènes : infections urinaires (impliqué dans 80 % des infections urinaires), les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), et les méningites néonatales et septicémies (Jaureguy. 2009).

2- *Klebsiella pneumoniae* :

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui appartient au genre *Klebsiella*. Il s'agit d'un bacille immobile, aéro-anaérobie, à Gram négatif, de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur (Abbott. 2007), 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).

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est subdivisée en 3 sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis*.

C'est une espèce ubiquitaire, et fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées, sol,...etc) et de la flore commensale du tube digestif et des voies respiratoires supérieures (Avril et al. 2000 ; Bagley et al. 1978).

Klebsiella pneumoniae est un germe opportuniste, responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés (Sahly et al. 2004 ; Stone et al. 2003). Il est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (Chung et al. 1992 ; Podschun et Ullmann. 1998).

3- *Enterobacter cloacae* :

Les *Enterobacter cloacae* sont des espèces du genre *Enterobacter* qui font partie de la famille des Enterobacteriaceae. Ils sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mesurant 0,6 à 1 µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur; ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche 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, donnent une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle et une réaction positive au test de Voges-Proskauer; leur température optimale de croissance est de 30 °C. Quatre-vingts pour cent des bacilles sont encapsulés (Hart. 2006).

Ces bactéries se rencontrent souvent dans le sol et dans l'eau; ils peuvent se loger dans les intestins d'humains et d'animaux et peuvent aussi se trouver dans les eaux usées.

Concernant le pouvoir pathogène, les *E. cloacae* sont des germes qui colonisent souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques. Ils ont été associés à des épidémies nosocomiales et sont considérés comme des pathogènes opportunistes (Hart. 2006 ; Pagotto et al. 2003). Ils peuvent causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et des infections de la cavité abdominale ou des intestins (Farmer et al. 2007). De plus, ils ont été observés dans des infections liées à des appareils intravasculaires et des infections au point de chirurgie (surtout des infections postopératoires ou liées à des dispositifs comme des prothèses biliaires).

4- *Citrobacter freundii* :

Les *Citrobacter freundii* sont de bacilles ou de coccobacilles Gram négatif, font partie de du genre *Citrobacter*, facultativement anaérobiques, de 0,3 à 1 µm de diamètre et de 0,6 à 6 µm de long (Abbott. 2007), dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches (Holmes et Aucken. 1998 ; Knirel et al. 2002).

Ces bactéries fermentent le mannitol et produisent du H₂S 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 normalement 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). Les infections du système nerveux central (SNC) sont plus courantes chez les nourrissons de moins de 2 mois que chez les enfants plus âgés et les adultes immunodéprimés; cependant, certains cas rares ont été signalés (Holmes et Aucken. 1998 ; Ryan. 2004).

II. Les β -lactamines :

1- Généralités :

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

Les antibiotiques formant la famille des β -lactamines, sont utilisés pour le traitement d'environ 55 % de toutes les infections bactériennes, en raison de leur grande efficacité et au peu d'effets secondaires qui leur sont attribués (Fisher et al. 2005 ; Matagne et al. 1999 ; Schroeder et al. 2002).

2- Structure :

Les β -lactamines ont en commun une structure appelée l'anneau β -lactame, qui est formée de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Cet anneau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules (Fisher et al. 2005).

La structure de base des pénicillines, l'acide 6-aminopénicillanique, est constituée d'un cycle thiazolidine lié au cycle β -lactame. Par contre, les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (noyau « céphème ») avec un atome de soufre en position 1 (Dbaibo. 2000). Leur noyau céphème est beaucoup plus stable que le noyau péname des pénicillines, ce qui permet aux céphalosporines de mieux résister globalement à l'action diverse des β -lactamases bactériennes.

3-Mode d'action des β -lactamines :

Les β -lactamines, analogues structuraux de la terminaison peptidyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane, ont pour fonction d'interagir avec un groupe de protéines, les PLPs, également appelées protéines de fixation de la pénicilline (PBP, pour Penicillin Binding Protein), des enzymes responsables de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane (Ghuysen. 1991 ; Nanninga. 1991). L'inhibition de ces transpeptidases, impliquées dans l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire, le cycle β -lactame se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation. Il entraîne une

interruption de la synthèse du peptidoglycane et une production subséquente d'enzymes autolytiques entraînant la mort cellulaire (Stratton. 2000).

Le peptidoglycane est un constituant majeur de la paroi cellulaire présent chez toutes les bactéries. Il forme un réseau tridimensionnel autour de la cellule et la protège de sa propre pression osmotique, et est essentiel à la croissance et à la division cellulaire (Matagne et al. 1998). Il s'agit d'un polymère formé de chaînes linéaires composées de répétitions alternatives d'un disaccharide contenant le N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM). Le dernier sucre de ce disaccharide se termine toujours par deux résidus D-alanine. L'assemblage final des ces unités, la transpeptidation, est un processus catalysé par les PBP se terminant par le clivage du résidu D-alanine terminal (Wilke et al. 2005).

4- Familles des β -lactamines :

La famille des β -lactamines est répartie en quatre principaux groupes : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (Figure N°1) (Bryskier. 1999).

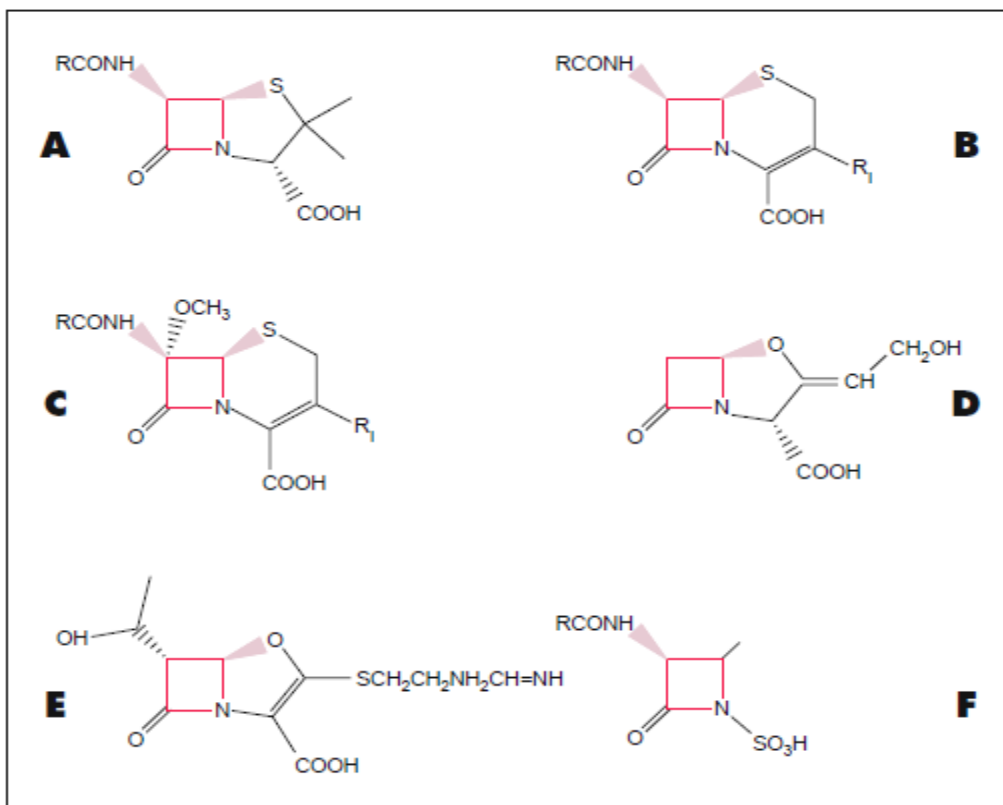


Figure N°1 : Structures de quelques β -lactamines (Charlier et al. 1998).

A: pénicillines ; B : céphalosporines; C : céphamycines ; D : acide clavulanique ; E : imipénème (carbapénème); F : monobactames.

4-1- Les pénicillines : (noyau péname) dont font partie la pénicilline G, la méticilline et les isoxazolylpénicillines (oxacilline et cloxacilline), les amino-benzylpénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam).

4-2- Les céphalosporines : (noyau céphème) :

Les céphalosporines sont des antibiotiques appartenant à la grande famille des bêta-lactamines. La mise en évidence de cette famille a été initiée en 1945 par le professeur BROTZU en Sardaigne (Gootz. 1990). Il a mis en évidence l'activité antibactérienne du filtrat d'un champignon dénommé *Cephalosporium acremonium*, isolé à partir d'eau de mer prélevée à proximité d'une décharge publique.

Ces β -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif.

Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité :

- **Première génération (C1G):** Comme la céfalotine, céfalaridine, sont essentiellement efficaces contre les bactéries pathogènes Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases inductibles comme *E. coli* et *Salmonella* spp. Ce sont les moins stables vis-à-vis de l'hydrolyse par les bêta-lactamases (Limbert et al. 1991).
- **Deuxième génération (C2G):** Comme le céfamandole, céfoxitine, sont caractérisées par une meilleure résistance aux β -lactamases à large spectre et un spectre d'action plus étendu au sein des entérobactéries, avec des variations selon les molécules (Limbert et al. 1991).
- **Troisième génération (C3G):** Telles que céfotaxime, ceftazidime (Cavallo et al. 2004), se distinguent par un accroissement important de leur spectre antibactérien et par leur stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillinases et les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.
- **quatrième génération (C4G):** Telles que céfépime, cefpirome, sont à large spectre et présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *P. aeruginosa* et une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites

(Hardman et Limbird. 1998). Elles sont une substitution possible aux céphalosporines de troisième génération pour le traitement de germes résistants.

4-3- Les carbapénèmes : (noyau pénème) qui sont les plus efficaces actuellement, exemples : imipénème, méropénème (Cavallo et al. 2004). Ils ont très actifs sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif.

L'imipénème est résistant à la plus part des β -lactamases, y compris les β -lactamases à spectre élargi. De très rares souches d'entérobactéries sont apparues capables de dégrader l'imipénème ont été décrites.

4-4- Les monobactames : (noyau azétidine) : représentés par l'aztréonam (Le Noc. 1999), qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3ème génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies.

Ils existent également des inhibiteurs de β -lactamases : les clavanes (acide clavulanique) et les pénicillines-sulfones (tazobactam et sulbactam). Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs des β -lactamases actives sur les pénicillines. Ils sont dépourvus d'activité antibiotique car ils n'inhibent pas les PLPs, ils sont utilisés en association avec d'autres β -lactamines (amoxicilline, ticarcilline et pipéracilline).

III. Résistance aux β -lactamines :

1- Notion de la résistance bactérienne :

Une bactérie est considérée comme résistante à un antibiotique quand la concentration de cet antibiotique au site de l'infection n'est pas suffisamment élevée pour inhiber la multiplication de cette bactérie ou de la tuer (Poole. 2004 ; Schwarz et Chaslus-Dancla. 2001).

2- Types de résistance:

Les entérobactéries sont soit naturellement sensibles aux β -lactamines (exemple: *Escherichia coli*), soit elles sont naturellement résistantes (exemple : les *Klebsiella sp* sont toujours résistantes à l'ampicilline), soit elles ont une résistance acquise (Vora et Auckenthaler. 2009).

2-1- Résistance naturelle:

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle est due à la présence de gènes chromosomiques communs à toutes

les bactéries d'une même espèce et transmise à la descendance. La résistance naturelle détermine les phénotypes « Sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis les antibiotiques (Mayer et al. 2000).

Chez les entérobactéries, la plupart des espèces produisent naturellement des β -lactamases chromosomiques soit de classe A (*Klebsiella* spp., *Citrobacter koseri*, *Escherichia hermanii*...), soit de classe C (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*...), voire les deux types d'enzymes (*Yersinia enterocolitica*) (Livermore. 1995). L'expression phénotypique de ces enzymes peut-être constitutive ou inductible par les β -lactamines elles-mêmes.

On constate un phénotype de résistance de pénicillinase de bas niveau inclut les espèces possédant une pénicillinase chromosomique constitutive (Zogheib et Dupont. 2005), exprimée à bas niveau chez *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *R. terrigena*, *Escherichia hermanii*, *C. gillenii*, qui est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines.

Les espèces *E. coli* et *Shigella* possèdent un gène *ampC* codant pour une céphalosporinase de la classe C d'Ambler donc résistante aux inhibiteurs. Elle est exprimée de manière constitutive à très bas niveau, avec une sensibilité à toutes les β -lactamines testées ou une sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de première génération et/ou aux aminopénicillines avec et sans inhibiteurs.

Des espèces d'entérobactéries, comme par exemple *Proteus vulgaris*, *P. penneri* possèdent une céfuroximase inductible. D'autres comme *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *Serratia marcescens*, *C. freundii*, *C. braakii*, *C. youngae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans* possèdent une céphalosporinase inductible, leur conférant une résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines de première génération et à l'action de l'acide clavulanique (Robin et al. 2012).

2-2- Résistance acquise:

Ce terme est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. Cette résistance acquise peut provenir par une mutation chromosomique (plutôt rare) (Chopra et al. 2003) ou par l'acquisition d'ADN étranger par le biais de plasmides (plutôt fréquent), de bactériophages ou de transposons (Davies. 1997). On parle de transfert horizontal de gènes de résistance et les mécanismes utilisés sont la conjugaison, la transduction et la transformation.

Les plasmides et les transposons déterminent la résistance aux antibiotiques de nombreuses β -lactamases. Une β -lactamase spécifique à une bactérie peut apparaître chez d'autres espèces par la suite, au vu de ces mécanismes de transfert relativement facile de matériel génétique. Comme l'acquisition des nouvelles familles de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui ont été décrites plus récemment à différentes espèces d'entérobactéries : CTX-M, OXA, SFO-1, GES-1.... (Bradford. 2001), et sont distribuées de façon inégale dans le monde.

En 1988, une étude a permis d'isoler 267 espèces d'entérobactéries productrices de BLSE dérivées de TEM (CTX-1 ; TEM-3 et CAZ-6) ou SHV (CAZ-5). Les épidémies d'espèce et la dissémination plasmidique sont associées à CTX-1 et CAZ-5 pour les *Klebsiella pneumoniae*, et à la CAZ-6 pour les *Enterobacter aerogenes*. Cette étude a permis de suggérer que le gène *bla* (CTX-1) a diffusé parmi les différents plasmides présents dans le même écosystème (De Champs et al. 1991).

3- Mécanismes de résistance aux β -lactamines :

De manière générale, les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux β -lactamines : il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie, ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique (exemples : les sites de liaison des pénicillines, les penicillin binding proteins (PBP), ce qui empêche la fabrication de la paroi de la bactérie). Mais le plus fréquemment, il s'agit d'enzymes détruisant les β -lactamines, les β -lactamases (Vora et Auckenthaler. 2009).

3-1- Diminution de la perméabilité :

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Ainsi, la sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (Kumar et Schweizer. 2005).

Différents isolats cliniques d'*E. coli* caractérisés par une altération ou expression réduite de porines de type OmpC et/ou OmpF ont démontré une susceptibilité réduite aux β -lactamines (Harder et al. 1981; Jaffe et al. 1982 ; Livemore. 1988).

Bien que plus rare, La disparition de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β - lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*) et chez *P. aeruginosa* (Nikaido. 2000 ; Yoshimura et Nikaido. 1982).

3-2- Hyperproduction de système d'efflux :

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (Walsh. 2003). Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, associée ou non à une perte des porines, et conférer une multirésistance aux antibiotiques.

L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux β -lactamines a été clairement identifiée dans plusieurs études en particulier chez *K. pneumoniae*. Cependant ce type de mécanisme touchant préférentiellement la céfoxitine et les C2G semble difficile à distinguer du point de vue phénotypique des résistances par modification des porines (Bialek-Davenet et al. 2011 ; Robin et al. 2012).

3-3- Modification des PLP :

La résistance aux β -lactamines, conférée par les PLPs, chez les bactéries à Gram négatif joue un rôle mineur dans la résistance comparativement aux bactéries à Gram positif (Spratt et al. 1989). Différents cas dont l'altération des PLP1 et 2 chez *Neisseria gonorrhoeae* (Faruki et Sparling. 1986) ont été décrits.

Cette résistance peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour des nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β -lactamines (Georgopapadakou. 1993).

Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécillinaam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1. Cependant, ce type de mécanisme reste très rare chez ce groupe bactérien (Neuwirth et al. 1995).

3-4- Production de β -lactamases:

Chez les entérobactéries, la production de β -lactamases est le mécanisme prédominant de résistance aux β -lactamines (Livermore. 2003).

3-4-1- Définition de β -lactamases:

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

Les β -lactamases sont des enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle bêta-lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (Ambler. 1980). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros. 1984).

La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli. 2007), et est également un facteur de diffusion.

3-4-2- Mode d'action:

Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Figure N°2). Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque (Medeiros. 1984).

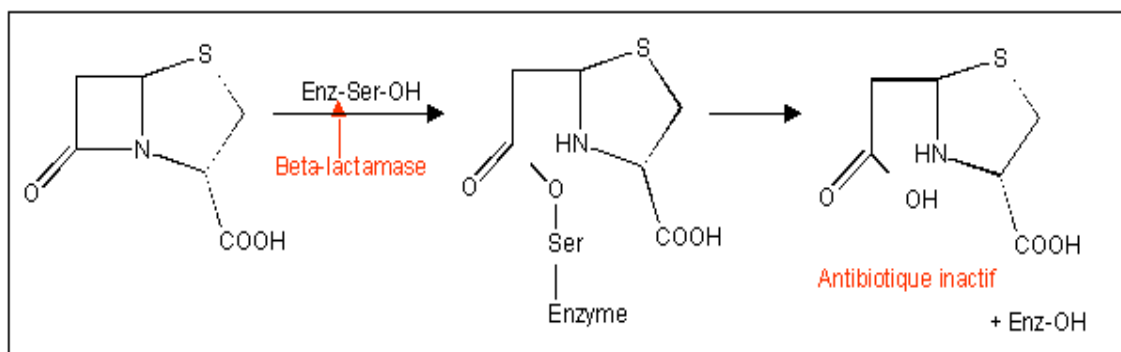


Figure N°2 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame (Barriat et Scotet. 2006).

La différence majeure entre les β -lactamases et les PLP réside dans la vitesse à laquelle l'acylenzyme est hydrolysé. En effet, si les PLP ne sont capables d'hydrolyser qu'un cycle β -lactame par heure (l'acylenzyme apparaît dans ce cas comme un intermédiaire stable), les β -lactamases les plus efficaces peuvent en hydrolyser 1000 par seconde, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse (Ghuysen. 1990 ; Massova et Mobashery. 1998).

3-4-3- Classification:

Aujourd'hui, les classifications d'Ambler et de Bush-Jacobi-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes (Bush et al. 1995).

- **Classification de Bush:** Établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse (Bush et al. 1995), dans laquelle les auteurs divisent ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. Cette classification phénotypique de β -lactamases pose un certain problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer leur susceptibilité à ces substrats et inhibiteurs (Jacoby et Medeiros. 1991).

Un autre aspect restrictif de cette classification relève du fait que l'attribution d'un acronyme à un gène de résistance n'a plus la même signification. Par exemple, les β -lactamases PSE, ou "*Pseudomonas*-specific enzymes", ont aussi été identifiées chez les Enterobacteriaceae, ce qui remet en question la pertinence de ce préfixe (Matthew et al. 1979).

- **Classification d'Ambler:** Initialement proposée par Ambler (Ambler. 1980), cette classification repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β -lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de chaque β -lactamase et ne change pas à cause des mutations. Cette nomenclature se compose de quatre groupes, soit les β -lactamases de classe A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active tandis que celles de classe B sont appelées métallo- β -lactamases (carbapénèmases) (Jacoby et Munoz-Price. 2005).

3-4-3-1- Les β -lactamases de classe A:

Les β -lactamases de classe A, d'origine chromosomique ou plasmidique, se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de β -lactame.

Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70)- induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et de céphalosporoate, analogue aux pénicillinoates, pour les céphalosporines.

Cette sérine est retrouvée dans le site actif de la β -lactamase qui se compose d'hélices α entourées de cinq feuilletts β anti-parallèles (Knox. 1995) et assure un fort taux de résistance aux pénicillines, céphalosporines et carbénicillines.

Toutefois, les β -lactamases de classe A sont généralement sujettes à l'inhibition par les inhibiteurs de β -lactamases (Livermore. 1995).

3-4-3-2- Les β -lactamases de classe B:

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

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

3-4-3-3- Les β -lactamases de classe C:

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

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases AmpC qui sont codées par des gènes qui étaient primitivement situés sur le chromosome de nombreuses bactéries à Gram négatif telles que *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter* spp.. Chez ces bactéries, l'expression de AmpC est inductible. Les gènes codant pour ces enzymes sont aussi présents chez *E. coli*, où ils ne sont pas inductibles. Ces enzymes sont résistantes à l'acide clavulanique (Philippon et al. 2002).

3-4-3-4- Les β -lactamases de classe D:

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

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

4- Les céphalosporinases plasmidiques :

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

L'expression de cette céphalosporinase est médiée par Amp-C (Hanson. 2003). La transmission plasmidique de promiscuité dans la famille des entérobactéries entraîne des taux très élevés de céphalosporinases chez *E. coli* qui porte un gène AmpC constitutif est faiblement exprimé (Bush. 2001).

Chez des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, cette résistance a été décrite pour la première fois avec MIR-1 en 1988, aux États-Unis (Philippon et al. 2002). Et la première enzyme de type DHA a été identifiée en 1992, à Dhahran, en Arabie Saoudite, chez une souche clinique de *Salmonella enterica* sérotype *Enteritidis* (Fortineau et al. 2001 ; Gaillot et al. 1997). La découverte de "céphalosporinases plasmidiques" originaires d'entérobactéries, indiquait une nouvelle et importante étape de la résistance acquise aux antibiotiques (C3G en particulier) par mobilisation de gènes chromosomiques (Philippon et al. 2002).

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

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

IV. β -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

1- Définition :

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (Knothe et al. 1983), il n'y a pas de consensus concernant la définition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (À l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (céfépime ou cefpirome) et l'aztréonam. Elles sont inhibées in vitro par les inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Livermore. 1995). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et céfoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (Paterson et Bonomo. 2005).

Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries. La présence de ce -type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli. 2007), et est également un facteur de diffusion.

Au sein des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sont les deux espèces les plus fréquemment porteuses de ces mécanismes de résistance. Toutefois, ces enzymes ont été retrouvées au sein de nombreuses autres espèces bactériennes, entérobactéries et bacilles

non fermentants (tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (Jacoby et Munoz-Price. 2005).

2- Différents types de BLSE :

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

2-1- BLSE de type TEM (Temoneira - nom du patient) :

La première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination (Datta et Kontomichalou. 1965).

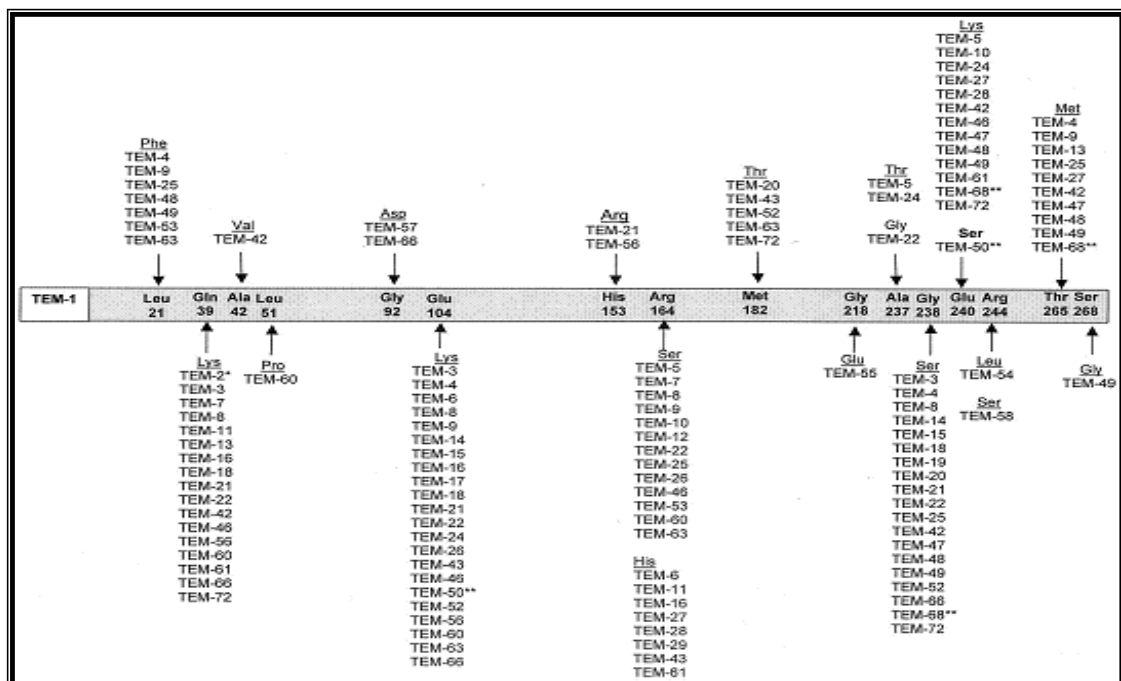


Figure N°3 : Les BLSE dérivées de TEM (Ambler et al. 1991).

La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (Bradford. 2001). Une seule de ces substitutions peut entraîner une importante modification de l'affinité de l'enzyme (Figure N°3). Par exemple, lorsque l'acide aminé devient une sérine, l'interaction entre le $-NH_3$ de la sérine et le groupement oxy-amino des C3G se traduit par une meilleure stabilité de la β -lactamine dans

le site actif de l'enzyme. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique).

Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes (Rodriguez-Villalobos et Struelens. 2006). Actuellement, il y a plus de 210 enzymes TEM ont été décrits (<http://www.lahey.org/studies/>).

2-2- BLSE de type SHV : (Sulfhydryl variable)

Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond a un gène *bla_{SHV}* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (Brisse et Verhoef. 2001 ; Haeggman et al. 2004). Actuellement, plus de 180 variants SHV BLSE ont été décrits (<http://www.lahey.org/Studies/>), et cette désignation SHV est liée au sulfhydryl variable.

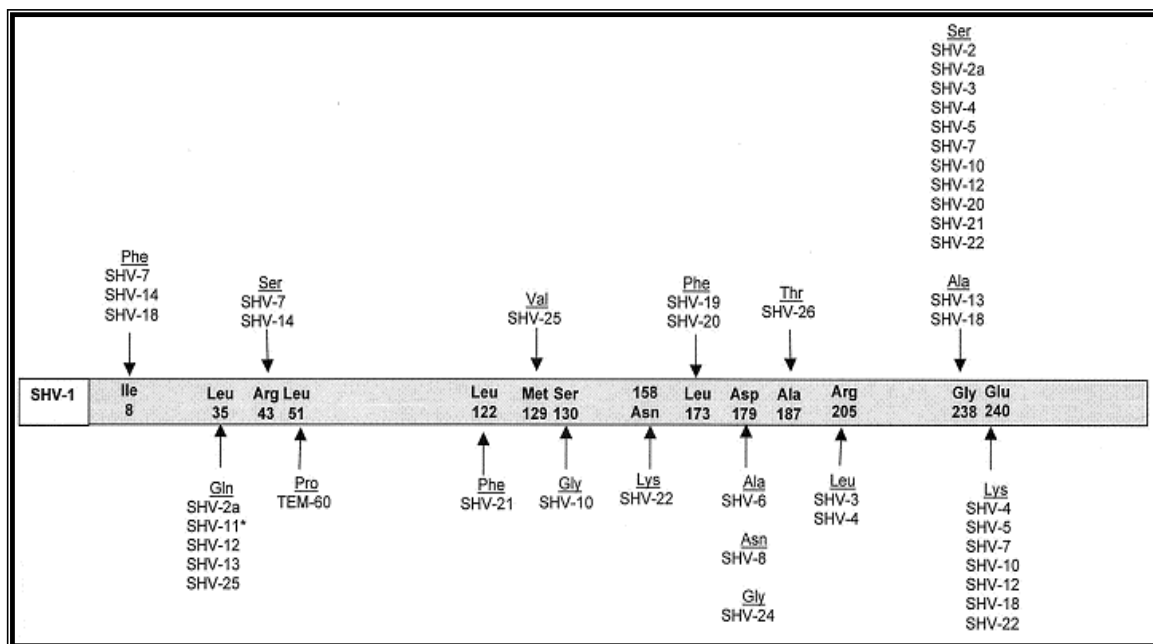


Figure N°4 : Les BLSE dérivées de SHV (Bradford. 1999).

La majorité des BLSE de type SHV est caractérisée par la substitution d'acides aminés Gly238Ser ou Gly238Ser et Glu240Lys (Figure N°4). Le résidu sérine à la position 238 est indispensable pour l'hydrolyse efficace du céfotaxime et le résidu lysine est crucial pour l'hydrolyse efficace de la ceftazidime (Elhani. 2012).

La majorité des BLSE de type SHV ont été décrites chez les souches de *K.pneumoniae*, toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* (Bradford. 2001). Ainsi, ces enzymes sont aussi présentes chez les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* (Naiemi et al. 2005 ; Poirel et al. 2004). La présence de la séquence d'insertion IS26 sur le gène SHV faciliterait l'acquisition du phénotype BLSE (Hammond et al. 2005).

2-3- BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich) :

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTXM-1) et ont depuis lors disséminé largement dans le monde (Thomson et Moland. 2000). Ces « nouvelles » enzymes représentent à l'heure actuelle les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial après leur diffusion rapide depuis les années 90 (Bonnet. 2004 ; Livermore et al. 2007).

Le groupe CTX-M (pour céfotaximase) confère à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone), céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime (Arlet et Philippon. 2003 ; Bonnet. 2004). Certaines d'entre elles ont évolué plus récemment par mutation (ponctuelle ou non) générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 et CTX-M-32 (Bonnet. 2004). Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique.

Récemment, plus de 150 variants CTX-M ont été décrits (<http://www.lahey.org/Studies/>) et ont été classés en 6 groupes phylogénétiques : le groupe CTX-M-1 avec M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29 et 30 ; le groupe CTX-M-2 avec M-4, 5, 6, 7, 20, et Toho-1 ; le groupe CTX-M-8 avec CTX-M-8, CTX-M-40 et CTX-M-63 ; le groupe CTX-M-9, avec M-13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 27, le groupe CTX-M-25 avec CTX-M-26 et enfin le groupe CTX-M-45. Ces nouvelles BLSE ne sont pas étroitement liées aux β -lactamases de type TEM ou SHV puisqu'elles ne présentent que 40 % d'homologie avec ces BLSE classiques (Elhani. 2012).

Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, entérobactéries d'isolement très rare en bactériologie médicale (Bonnet. 2004 ; Humeniuk et al. 2002). La β -lactamase naturelle de *Kluyvera cryocrescens* (KLUC-1) présente 95 à 100 % d'identité avec les enzymes plasmidiques du phylum CTX-M-1 (Decousser et al. 2001).

Ainsi le phylum CTX-M-2 dérive de la b-lactamase naturelle de *Kluyvera ascorbata* (codé par le gène *bla_{KLUA}*) alors que le phylum CTX-M-8 vient de *K. georgiana* (codé par le gène *bla_{KLUG}*) (Poirel et al. 2002), cette espèce serait également à l'origine du groupe 9 (Olson et al. 2005).

La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion ISEcp1 (Bradford. 2001).

2-4- Autres types de BLSE :

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

3- Facteurs de risque :

Différents facteurs de risque ont été fréquemment associés avec l'acquisition d'une souche productrice de BLSE. Le premier facteur est concerné l'utilisation accrue des antibiotiques de type céphalosporines de 3ème génération quelques années avant l'apparition des premières BLSE, et par conséquent, la mise en évidence d'un lien de causalité entre cette utilisation et l'émergence des BLSE (Sirot. 1989).

En d'autres termes, les antibiotiques exercent une pression de sélection non-négligeable (Jacobson et al. 1995), et cette pression de sélection est d'autant plus marquée que le nombre de patients traités est important et que la durée de l'antibiothérapie est longue (Asensio et al. 2000). De plus, on peut constater que la restriction de l'utilisation des antibiotiques a permis la diminution du nombre de BLSE (Chow et al. 1991 ; Follath et al. 1987).

Le deuxième facteur de risque concerne la dissémination des souches résistantes et englobe d'une part le problème des « réservoirs » et d'autre part le problème de la transmission des germes.

De plus, différents facteurs en relation avec l'acquisition de bactéries productrices de BLSE concerne des patients gravement malades, suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des dispositifs invasifs (cathéters veineux, sonde urinaire ou tube endotrachéal). Un séjour de longue durée implique une plus longue exposition au risque d'acquérir une bactérie multi-résistante comme *E. coli* et *Klebsiella* (Kassis-Chikhani et al. 2004 ; Wiener et al. 1999), ce qui signifie une augmentation du risque pour le patient d'être colonisé (Goldstein et al. 1995). D'autres facteurs de risque sont la malnutrition, l'hémodialyse, la nutrition parentérale totale, l'admission en réanimation ou l'hospitalisation préalable (Lautenbach et al. 2001 ; Pena et al. 1997).

Enfin, une étude canadienne retrouvait chez les patients ayant une infection communautaire par *E. coli* BLSE 8 facteurs de risque : l'hémodialyse, l'incontinence urinaire, un cancer, une insuffisance rénale, un diabète et un voyage récent en Inde, en Afrique ou au Moyen- Orient (Laupland et al. 2008).

Deuxième Partie :
Matériel et Méthodes

1- Présentation de l'hôpital de Laghouat:

L'hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat est un hôpital général, accueillant des enfants et des adultes. Il a été construit en 1985, comprenant 240 lits répartis en 13 services médicaux et chirurgicaux incluant un service de réanimation. En général, 43 000 admissions sont enregistrées chaque année.

2- Patients et prélèvements :

C'est une étude prospective, réalisée sur une période de trois ans allant du 1er janvier 2010 au 31 décembre 2012. Elle a porté sur 748 patients hospitalisés à l'Hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie.

Les prélèvements correspondaient aux différents sites de colonisation (urines, cathéters, pus, hémocultures et prélèvements rectaux), isolés essentiellement aux différents services de :

- Un service de médecine homme ;
- Un service de médecine femme ;
- Un service de chirurgie générale ;
- Un service d'orthopédie ;
- Un service de pneumologie ;
- Un service de réanimation ;
- Un service de pédiatrie ;
- Un service de gynéco-obstétrique.

Certaines données épidémiologiques comme l'âge, le sexe et l'origine de service ont été relevées en premier temps pour chaque patient.

Tous les patients hospitalisés plus de 48 heures ont été inclus dans l'étude. Les doublons (même souche chez le même patient pendant toute la durée de l'étude) ont été éliminés.

Les prélèvements ont été réalisés par un écouvillonnage, cette technique consiste à faire poser un écouvillon stérile humidifié avec l'eau distillée stérile sur le site de colonisation pathologique.

3- Ensemencement :

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée par la gélose de Mac-Conkey pour l'isolement des entérobactéries.

4- Isolement et purification :

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

5- Identification de souches: (Galerie API 20E)

➤ Principe:

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

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

➤ Technique:

On réunie fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

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

Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

➤ Lecture:

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

6- Sensibilité aux antibiotiques:

➤ Principe:

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM. 2010), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

➤ Technique:

A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) a été préparée en équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 108 UFC/ml).

A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée; puisensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton.

➤ Application des disques d'ATB:

Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'un distributeur ou par un pince en appuyant légèrement ; puis incubés pendant 18-24h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

➤ Lecture:

La lecture a été faite par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe N°1. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance. Dans notre travail, la souche de référence étudiée est: *E.coli* ATCC 25922 souche sensible, utilisée pour contrôler les paramètres de conformité (conformité des résultats).

7- Tests de détection de BLSE:

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

7-1- Test de synergie:

➤ **Principe:** (Jarlier et al. 1988).

Le teste de synergie permet la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne".

➤ **Technique:**

La recherche de β -lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, FEP 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boites de Pétri (Figure N°5). Incubation pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C.

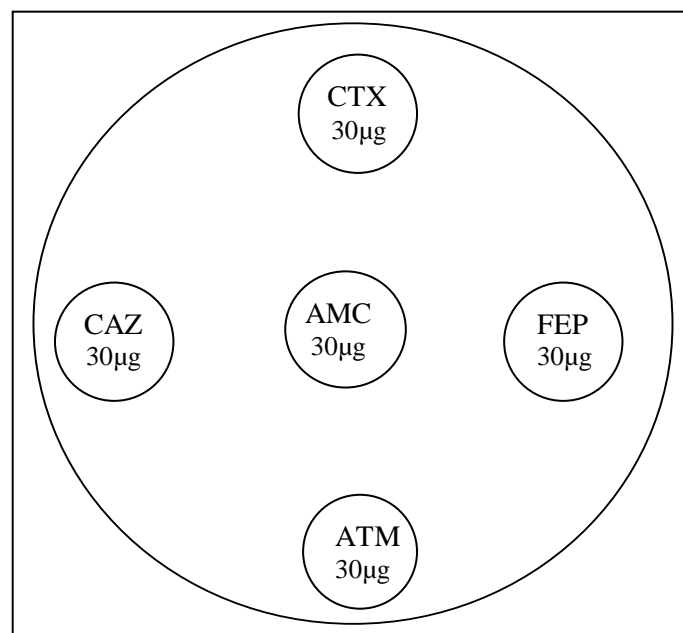


Figure N°5 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

➤ **Lecture:**

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

7-2- Test du double disque : (appelé aussi test espagnol):

➤ **Principe:**

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

➤ **Technique:**

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm selon la figure N°6.

On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G).

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

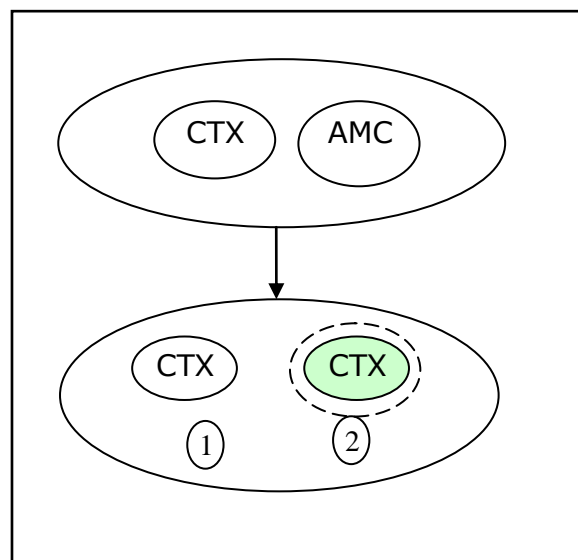


Figure N°6 : Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (Rahal et al. 2005).

➤ **Lecture:**

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

7-3- Test à la cloxacilline :

➤ **Principe:**

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

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

➤ **Technique:**

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

8- Extraction enzymatiques de β -lactamases :

Après une agitation au bain marie pendant 4 heures d'une pré-culture de souches en 10ml de bouillon BCC, 1 ml de cette pré-culture a été récupérée dans un tube Falcon de 50 ml contenant 25 ml de bouillon TS+ extrait de levure (5g/l) et l'antibiotique correspondant à la résistance étudiée (en règle générale : 0,5 mg/l de Céfotaxime), incubée à 37°C au bain marie agité toute une nuit.

Après l'incubation, la culture a été centrifugée pendant 15 min à 10000 trs/min à 4°C, puis le culot a été remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile. A fin d'extraire les β -lactamases, il est nécessaire de casser la paroi des entérobactéries à l'aide d'ultrason, pour cela la suspension a été soumise à une sonication sous la hotte deux fois pendant cinq secondes.

Après centrifugation pendant 20 min à 10000 trs/min à 4°C, le surnageant contenant l'extrait brut de β -lactamases a été récupéré et congelé à -20°C.

9- Isoélectrofocalisation (IEF) :

➤ Principe :

Le point isoélectrique pI de β -lactamases est un paramètre souvent recherché pour caractériser ces enzymes, il s'agit d'une méthode de séparation des protéines d'un mélange basée sur la différence de point isoélectrique (pI).

La focalisation isoélectrique de β -lactamases a été réalisée avec des gels de polyacrylamide contenant des ampholines avec une gamme de pH de 3,5 à 10 (Bonnet et al. 2000a).

➤ Technique:

Sur le gel polyacrylamide (préparé la veille) contenant les ampholytes permettant la création d'un gradient de pH de 3.5 à 10, deux bandes buvards imbibés ont été disposées : l'un du côté anode (+) avec de l'acide Aspartique à 0,04 M et l'autre du côté cathode (-) avec une solution NaOH 1M.

En suite, 25 μ l de chaque extrait enzymatique (échantillons et témoins) ont été déposés sur chaque petit morceau de buvard à environ 1cm de l'anode,

Le système Pharmacia LKB electrophoris (appareil d'isoélectrofocalisation) a été réglé à une tension : 3000Volts, un courant : 150 mA, une puissance : 15Watt, la température : 15°C, et le temps de migration : 1h 30min.

La migration de β -lactamases a été alors révélée par dépôt d'un gel d'iode sur le gel polyacrylamide, au bout d'un certain temps, l'apparition d'éclaircissements et des zones de décoloration au niveau de la migration des extraits ont été apparues. Une lecture de tous les points isoélectriques de β -lactamases des souches analysées a été faite en comparant avec les témoins.

Des β -lactamases avec les pIs connues ont été utilisées comme témoins: CTX-M-1 (pI 8.4), CTX-M-14 (pI 7.9), CTX-M-15 (pI 8.6).

10- Extraction d'ADN total:

L'extraction d'ADN a été réalisée par la préparation d'une suspension de souches à étudier dans un 200 μ l d'eau distillée. Après l'ébullition pendant 10 minutes de cette suspension, puis la centrifugation pendant 7 minutes à 13000 trs/min ; le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, et conservé à -20 °C.

11- Caractérisation de β -lactamases par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

➤ **Principe :** (Bonnet et al. 2000b ; Hennequin et al. 2012)

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

➤ **Technique :**

La détection des gènes codants les β -lactamases BLSE et les céphalosporinases plasmidiques (DHA-1) a été effectuée par PCR (Polymerase Chain Reaction); les conditions opératoires et les amorces utilisés ont été décrites dans le tableau N°1.

Le mixte pour les réactions de PCR étant composé de : 23.75 μ l d'eau distillé stérile, 5 μ l de chaque amorce (dilués au 1/10 ème), 1 μ l de dNTP, 10 μ l de tampon de réaction PCR 5X et 0,25 μ l de Taq ADN polymérase, et 5 μ l d'extrait d'ADN brut (dilués au 1/10 ème).

L'ADN a été amplifié dans un volume final de 50 μ l, dans un thermocycleur : soit le Biometra T Personal (Labgene) soit le Primus 96 plus (Biotech).

Pour chaque PCR, il faut toujours un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée).

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

Tableau N°1 : Amorces utilisés pour les PCR et séquençages.

	Amorces	Séquences	T° d'hybridation
TEM	TEM A	5' - TAA AAT TCT TGA AGA CG - 3'	44
	TEM B	5' - TTA CCA ATG CTT AAT CA - 3'	
SHV	SHV 105q	5' - TTA GCG TTG CCA GTG CTC GAT - 3'	54
	SHV 149p	5' - CGC TTC TTT ACT CGC CTT TAT - 3'	
CTX-M-1	CTXM1 A2	5' - CTT CCA GAA TAA GGA ATC - 3'	48
	CTXM1 B2	5' - CCG TTT CCG CTA TTA CAA - 3'	
DHA	AmpR- AmpcF	5' - GGTA AAACTGAGATGACGGGC - 3'	56
	AmpCR	5' - TTATTCCAGCGCACTCAA AAT - 3'	
ERIC-PCR	ERIC2	5' - AAG TAA GTGACT GGG GTG AGC G - 3'	64

12- Séquençage :

Quand la PCR était positive, l'amplicon était purifié et séquencé chez GATC biotech : (GATC Biotech AG, European Custom Sequencing Centre, Gottfried-Hagen-Straße 20), afin d'identifier précisément les β -lactamases recherchés.

13- Typage moléculaire par ERIC-PCR :

➤ **Principe :** (Dumarche et al. 2002)

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) est une technique génotypique de typage épidémiologique pour établir le degré de parenté entre les souches cliniques, si les bandes sont identiques ou différentes. Elle utilise des séquences ERIC2 (Tableau N°2) pour l'amplification par PCR.

➤ **Technique :**

L'ADN total de chaque souche a été testé par ERIC-PCR. Pour cette réaction, l'ADN a été amplifié à l'aide de l'amorce ERIC-2 avec le programme suivant: 5 min à 94°C et 1 min à 36°C ; puis 36 cycles de 3 min à 72°C, 1 min à 94°C, et 1 min/30sec à 36°C, et à la fin 10 min à 72°C.

Les conditions de préparation de mixte pour ERIC-PCR ont été réalisées comme suivantes: eau distillée stérile: 28,4 µl, Dntp (Eurogentec) : 3,2 µl, MgCl₂ : 3 µl, Tampon 5X : 5 µl, Amorce ERIC2 : 5 µl, Taq ADN polymérase (Promega) : 0,4 µl, et 5 µl d'extrait d'ADN brut dilué au 1/100^{ème} avec de l'eau distillée stérile.

L'ADN a été amplifié dans un volume final de 50 µl, dans un thermocycleur : soit le Biometra T Personal (Labgene) soit le Primus 96 plus (Biotech).

Les produits de la PCR ont été migrés sur un gel d'agarose à 1.5% dans une cuve pour électrophorèse pendant 1 heure. Après la migration, le gel a été soumis sous U.V pour la révélation.

14- Transfert génétique par conjugaison:

➤ **Principe:** (Sambrook et al. 1989)

Dans ce type de transfert, le contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice est indispensable. La mise en évidence de plasmides conjugatifs portants des caractères de résistance aux antibiotiques, se fait par un croisement de la souche sauvage (donatrice) avec une souche réceptrice *E. coli* C600 Rif R (résistant à la Rifampicine) dépourvue de plasmides et possédant dans ce cas, un caractère de résistance chromosomique (Rifampicine) auquel la donatrice est sensible.

Les bactéries réceptrices ayant acquis le(s) caractère(s) de résistance aux antibiotiques transférable(s) sont sélectionnées et testées par l'antibiogramme pour déterminer leur profil d'antibiorésistance.

➤ **Technique:**

On effectue un isolement de souches donatrices et réceptrices sur gélose Muller Hinton (MH), et après l'incubation pendant 18-24h à 37°C ± 1°C; on cultive à 37°C sous agitation pendant 3 à 4 heures les souches donatrice et réceptrice chacune dans 5ml de Bouillon Cœur Cerveau (B.C.C) (Bouillon nutritif riche). Deux types de croisement entre les souches réceptrices et donatrices ont été réalisés : en milieu liquide et en milieu solide :

a) Contact liquide :

Dans un tube eppendorf de 2 ml, on prépare un mélange de deux bouillons comme suivant : 500 µl de la souche donatrice avec 750 µl de la souche réceptrice, on mélange doucement puis on incube à 37°C pendant 40 minutes au bain marie sans agitation.

Après la centrifugation de mélange des suspensions à 3000 trs/min pendant 10 minutes, on élimine le surnageant et on rajoute 100 µl d'eau distillée stérile pour remettre le culot en suspension.

À l'aide d'une pipette râteau, on étale 100 µl de cette suspension sur une boîte gélosée au milieu Mueller-Hinton contenant deux antibiotiques : le céfotaxime (1µl/ml) et la rifampicine (300µl/ml), puis incubation toute une nuit à l'étuve à 37°C.

b) Contact solide:

On réalise sur une boîte de gélose Mueller-Hinton, deux spots identiques de la manière suivante : on dépose 1 goutte de 50 µl de la souche donatrice et par-dessus 1 goutte de même volume de la souche réceptrice.

On laisse sécher les spots sans bouger la boîte de pétri sur la paillasse et une fois secs, on incube à l'étuve à 37°C pendant toute la nuit.

Après l'incubation, on récupère à l'aide d'une pipette la totalité d'un deux spot et le mélangé avec 100 µl d'eau distillée stérile, puis on étale cette suspension par une pipette râteau sur une boîte gélosée au milieu Mueller-Hinton contenant deux antibiotiques : le céfotaxime (1µl/ml) et la rifampicine (300µl/ml), puis incubation toute une nuit à l'étuve à 37°C.

➤ Lecture:

Les transconjugants poussées dans les boites de sélection ont été ré-isolés et testés vis-à-vis les antibiotiques pour détecter la présence de phénotype de résistance aux céphalosporines de 3ème génération.

➤ Souche de référence:

Nous avons utilisés la souche *E. coli* C600, présentant une sensibilité à la plus part des ATB et une résistance chromosomique à la Rifampicine (RIF^R).

15- Extraction de l'ADN plasmidique:

➤ **Principe:** (Kado et Liu. 1981)

La méthode de la lyse alcaline est une technique rapide permettant l'extraction des plasmides (ADN extra-chromosomiques) de différentes tailles, de petite et de grande taille (>100kb). Elle met à profit les propriétés structurales de l'ADN plasmidique, qui est libérée après la lyse des bactéries sous des conditions qui dénaturent l'ADN chromosomique par traitement à la chaleur et un traitement par du SDS alcalin.

L'ADN chromosomique, les protéines et les débris cellulaires sont éliminés par action du phénol/chloroforme. L'ADN plasmidique se retrouve dans la phase aqueuse où "L'extrait brut" non précipité est analysé immédiatement sur gel d'agarose.

➤ **Technique:**

A partir d'une culture sur gélose MH réalisée la veille, autour du disque de l'antibiotique de résistance; on centrifuge 3ml de la suspension bactérienne (dans 1ml de TAE 1X) dans un microtube Eppendorf à 13000 trs/min pendant 2min, puis on resuspend le culot bactérien dans 200µl de tampon TAE 1X.

Suivant, on Ajoute 400µl de la solution de lyse et on mélange très doucement par inversion du microtube. Après le chauffage à 55 C° pendant 1 heure au bain-marie, on ajoute 700µl de phénol/Chloroforme et on mélange bien très doucement.

En fin, on centrifuge le tout à 6000 trs/min pendant 15 min, et on récupère délicatement la phase supérieure dans un nouveau microtube.

16- Electrophorèse d'ADN plasmidique:

➤ **Principe:**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet de séparer les molécules chargées selon leur taille respective. Sous l'action d'un champ électrique, les acides nucléiques étant chargés négativement, vont migrer vers l'anode plus ou moins rapidement en fonction de leur poids moléculaire (Sambrook et al. 1989).

➤ **Technique:**

a) Préparation du gel:

La concentration en agarose est de 0.7% dans le tampon TAE 0.5X (0.9 g d'agarose pour 130 ml de TAE 0.5X). L'agarose est solubilisé dans un four à micro-ondes. Une fois refroidi (45°C), on verse l'agarose dans un moule pourvu d'un peigne creusant des puits, permettant de déposer les échantillons.

Lorsque le gel se solidifie, on retire le peigne et les rubans adhésifs qui fermaient les extrémités du moule. Ainsi, l'ensemble gel et moule est placé dans la cuve d'électrophorèse, puis la cuve à électrophorèse est alors remplie avec le tampon TAE à 0.5X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé.

b) Electrophorèse:

La technique utilisée est celle du gel immergé horizontalement dans le tampon d'électrophorèse TAE à 0.5X. Dans les puits du gel, on dépose 36µl d'un mélange contenant 30µl de la solution d'ADN et 6µl de la solution de dépôt.

On branche le générateur après avoir raccordé la cuve environ 4 heures sous une tension de 100 volts.

c) Révélation:

Après la migration, le gel a été immergé dans une solution de TBE contenant bromure d'éthidium pendant 15 à 20 minutes sous agitation mécanique. La lecture se fait sous UV.

Troisième Partie :
Résultats et Discussion

I. Résultats :

1- Souches bactériennes:

Durant notre étude, sur 748 patients hospitalisés plus de 48 heures, 806 prélèvements cliniques ont été effectués et 405 souches d'entérobactéries ont été isolées des patients hospitalisés aux différents services de l'hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie, ce qui représente 57% de l'ensemble des bactéries à Gram négatif isolées pendant la période d'étude.

Les souches d'entérobactéries identifiées étaient réparties comme suit : 188 *Escherichia coli*, 112 *Klebsiella pneumoniae*, 9 *Klebsiella oxytoca*, 58 *Enterobacter cloacae*, 8 *Enterobacter aerogenes*, 9 *Citrobacter freundii*, 2 *Citrobacter coserie*, 6 *Morganella morgani*, 9 *Proteus mirabilis*, 4 *Salmonella typhi*.

1-1- Fréquence des EBLSE :

Au total, nous avons relevé la présence de 30 souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu, provenant de 30 patients, soit une souche par malade, réparties comme suit : 13 *Escherichia coli*, 9 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Enterobacter cloacae*, et 2 *Citrobacter freundii* (Figure N°7).

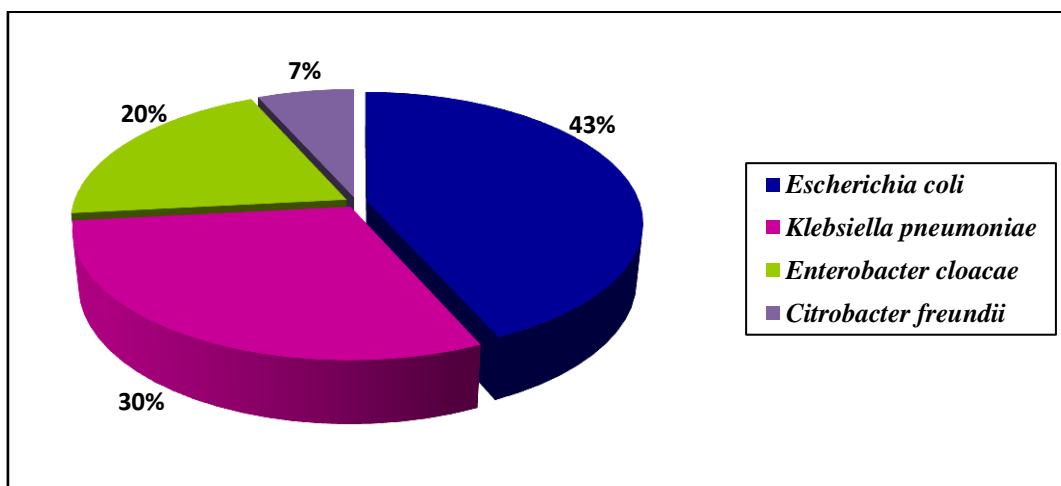


Figure N°7: Répartition de l'ensemble des entérobactéries productrices de BLSE.

1-2- Répartition des EBLSE selon l'espèce par année :

La distribution des espèces bactériennes d'EBLSE isolées pour chaque année est présentée dans le Tableau N°2. *E. coli* était la première espèce isolée parmi les EBLSE avec des proportions au sein des EBLSE de 60% (3/5) en 2010, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* étaient les espèces les plus fréquemment isolées après *E. coli*, représentant respectivement 33% et 22% des EBLSE isolées en 2011 ; et un même taux 25% en 2012. Dans le même temps, on a observé une diminution vis-à-vis les souches *Citrobacter freundii* productrices de BLSE, qui sont isolées seulement en 2012 soit 12%.

Les prévalences annuelles des entérobactéries productrices de BLSE augmentaient significativement depuis les deux dernières années d'étude : soit 7% en 2011, et 13% en 2012.

Tableau N°2 : Répartition des espèces d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) par année d'étude.

EBLSE	2010		2011		2012	
	%	(n)	%	(n)	%	(n)
<i>Escherichia coli</i>	4%	(3/69)	7%	(4/54)	9%	(6/65)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7%	(2/29)	6%	(3/50)	12%	(4/33)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0%	(0/16)	9%	(2/22)	20%	(4/20)
<i>Citrobacter freundii</i>	0%	(0)	0%	(0/5)	50%	(2/4)
Total	4%	(5/114)	7%	(9/131)	13%	(16/122)

n : le rapport entre le nombre d'EBLSE par rapport au nombre total d'entérobactéries isolées ;
% : Pourcentage

1-3- Répartition des EBLSE selon la nature des prélèvements :

La répartition des sites anatomiques présentée dans la figure N°8, montre que le site le plus concerné par les EBLSE était les urines (40%), suivis l'appareil digestif (23%) pour lequel les germes ont principalement été isolés à partir des prélèvements rectaux, puis des prélèvements cathéter (17%), pus (13%), et hémoculture (7%),

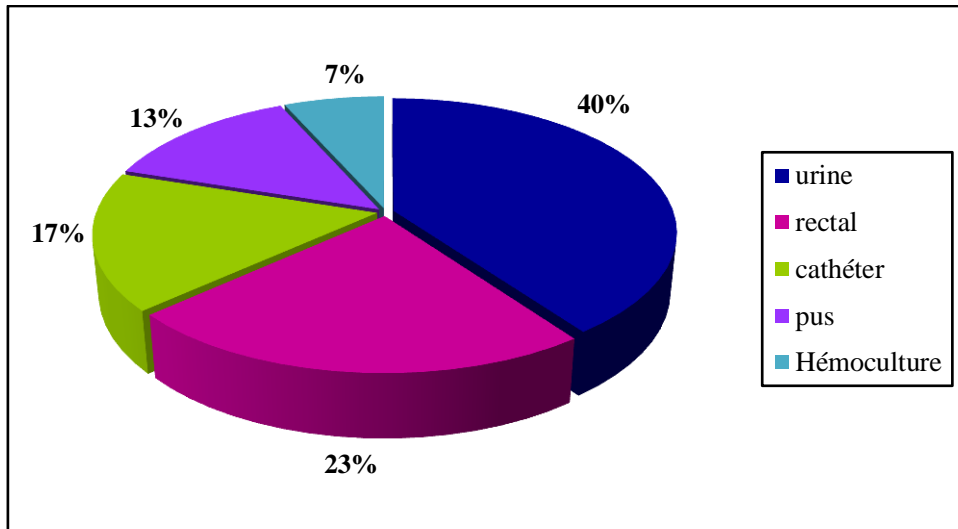


Figure N°8 : Répartition de souches EBLSE selon la nature des prélèvements.

1-4- Répartition des EBLSE en fonction des services :

Certains services hospitaliers sont apparus plus concernés par le problème de résistance liée à la production de BLSE, notamment les services d'orthopédie et de réanimation d'où provenaient respectivement de 30% et 27%, suivi le service de médecine femme avec un taux de 20% (Figure N°9).

Les autres services étaient répartis comme suivant : pneumologie (7%), gynéco-obstétrique (7%), pédiatrie (3%), chirurgie générale (3%), et médecine homme (3%).

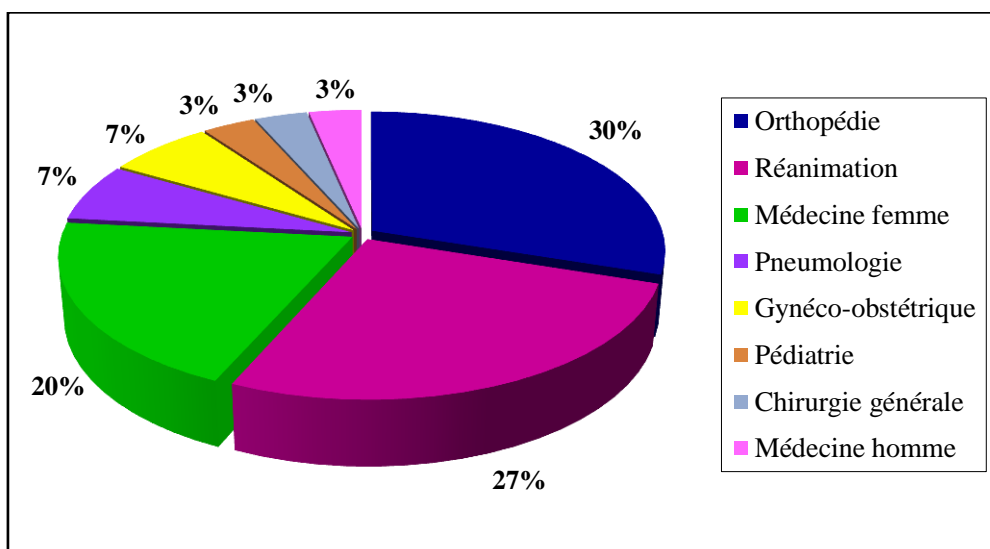


Figure N°9 : Répartition de souches EBLSE selon le service d'origine.

2- Caractéristiques des patients :

L'âge des 30 patients porteurs d'une souche d'EBLSE varie de 8 mois à 85 ans avec un âge médian de 45 ans. Dix-huit des patients, soit 60 %, sont de sexe féminin.

Pendant la période 2010-2012, le délai médian entre l'admission du patient dans l'établissement et l'isolement d'une souche d'EBLSE était de cinq à sept jours. La durée de séjour des patients à l'hôpital est variée dans l'intervalle: 10 jours à 150 jours.

Parmi les 30 patients porteurs ou infectés par une EBLSE, 3 patients (10 %) étaient porteurs ou infectés dans les 48 premières heures faisant suite à leur admission dont un patient avait été déjà hospitalisé la fin d'année 2009 (porteur la souche Ec2) pendant deux mois dans le même hôpital de Laghouat, et les deux autres patients avaient été aussi hospitalisés mais dans d'autres wilaya : Un patient était hospitalisé en décembre 2011 (porteur la souche Kp6) à l'hôpital de Ghardaia et l'autre patient était hospitalisé en mars 2012 (porteur la souche Ec10) à l'hôpital d'Alger. Donc ces trois patients étaient d'anciens porteurs des EBLSE.

Les principales caractéristiques générales et moléculaires de souches ont été rapportées dans le Tableau N°3.

3- Profil de sensibilité aux antibiotiques :

Le test de double synergie était positif pour 27 souches d'entérobactéries étudiées (Figure N°10). Les trois autres souches ont montré un test de double synergie négatif.

Pour ces souches, il a été nécessaire de pratiquer le test de synergie sur MH contenant de la cloxacilline à cause de la forte expression de leur céphalosporinase.

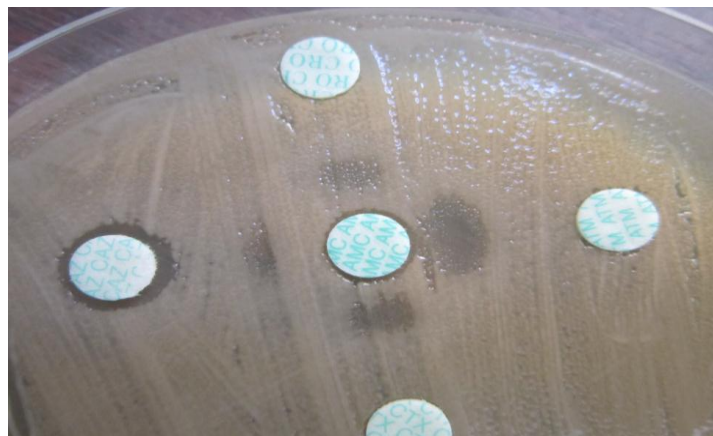


Figure N°10 : Image de synergie chez une souche de *K. pneumoniae*.

L'antibiogramme effectué sur chaque espèces d'EBLSE a permis d'étudier leurs profils de résistance vis-à-vis les antibiotiques testés.

3-1- Sensibilité aux β -lactamines :

Durant la période d'étude, le taux de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération a connu une augmentation très remarquable.

Les résultats de l'étude de la sensibilité des 30 isolats d'entérobactéries productrices de BLSE aux 32 différents antibiotiques utilisés montrent que toutes les souches sont 100% résistantes à l'amoxicilline, ticarcilline, céfalotine, pipéracilline (Figure N°11). Ainsi, les souches étaient résistantes à la plupart des céphalosporines de 3^{ème} génération et l'aztréonam, sauf le céfépime où la moitié de souches *E. coli*, *E. cloacae* et *C. freundii* étaient résistantes.

En ce qui concerne la résistance aux β -lactamines associés à l'acide clavulanique, on assiste à une résistance très remarquable vis-à-vis les associations amoxicilline+ acide clavulanique et ticarcilline + acide clavulanique.

En revanche, les antibiotique pipéracilline/tazobactam et ceftazidime+ acide clavulanique demeuraient plus actifs à la plupart de souches soit des taux de sensibilité étaient respectivement 84,61% et 69,23% de souches *E. coli*, 33.3% et 55.5% pour les souches *K. pneumoniae*, 100% pour les *E. cloacae*. Les deux souches de *C. freundii* ont montré sensibles à pipéracilline/tazobactam, par contre résistantes à ceftazidime+ acide clavulanique.

Nous avons signalé aussi dans ce travail, la présence de trois souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la céfoxitine, suggérant la possible production d'une céphalosporinase plasmidique de type AmpC.

L'imipénème reste l'antibiotique de choix avec la sensibilité de toutes les souches.

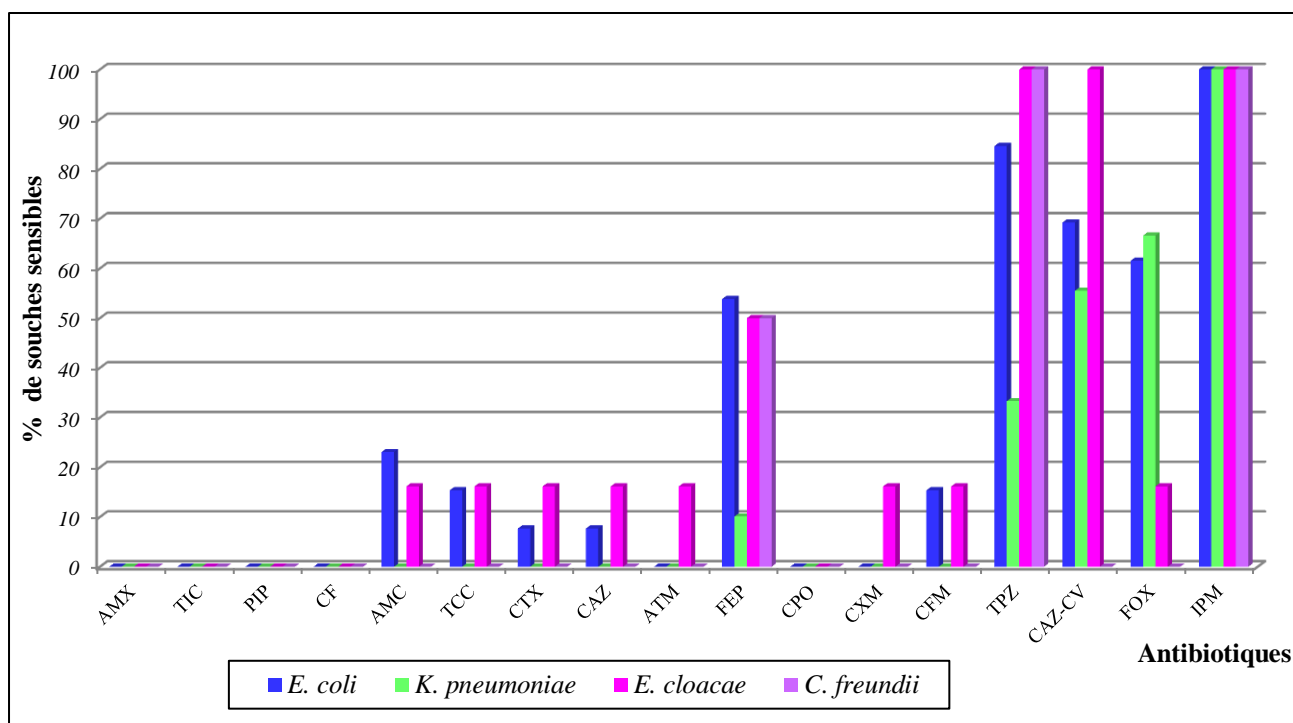


Figure N°11 : Sensibilité aux β -lactamines de souches entérobactéries productrices de BLSE.

3-2- Sensibilité aux aminosides :

Des résistances associées aux aminosides sont retrouvées chez toutes les souches EBLSE, ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique.

Les souches *E. coli* et *E. cloacae* présentent un profil particulier aux aminosides avec une résistance assez marquée, de 38% et 67% respectivement pour la kanamycine et tobramycine, et de 31% et 67% respectivement pour la gentamicine et nétilmicine (Figure N°12),

Les souches *K. pneumoniae* présentent également des taux de résistance très importants, soit 100% aux kanamycine et tobramycine, et 78% et 90% respectivement aux gentamicines et nétilmicines.

Concernant les souches *C. freundii*, on assiste à une résistance 100% vis-à-vis les quatre aminosides.

En revanche l'amikacine reste plus efficace sur la majorité de souches avec un taux de sensibilité 100%, sauf les espèces *K. pneumoniae*, où 44% de souches étaient sensibles.

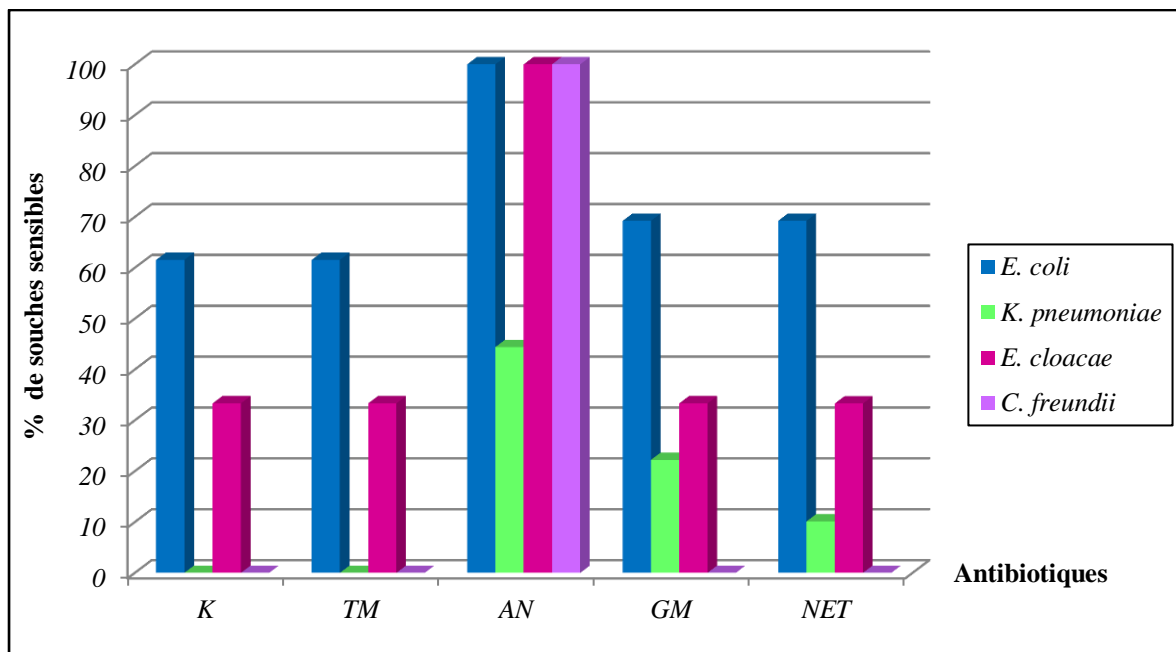


Figure N°12 : Sensibilité aux aminosides de souches entérobactéries productrices de BLSE.

3-3- Sensibilité aux quinolones :

La résistance de souches EBLSE aux Céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE est associée à une résistance aux quinolones et fluoroquinolones où elle a été observée chez 90% des souches de *K. pneumoniae* et 50% des souches *E. cloacae*.

La résistance de souches *E. coli* aux quinolones et fluoroquinolones est de 54 % pour l'acide nalidixique, 69% pour l'ofloxacine et de 46 % pour la ciprofloxacine.

Les souches *C. freundii* étaient sensibles aux fluoroquinolones (Figure N°13).

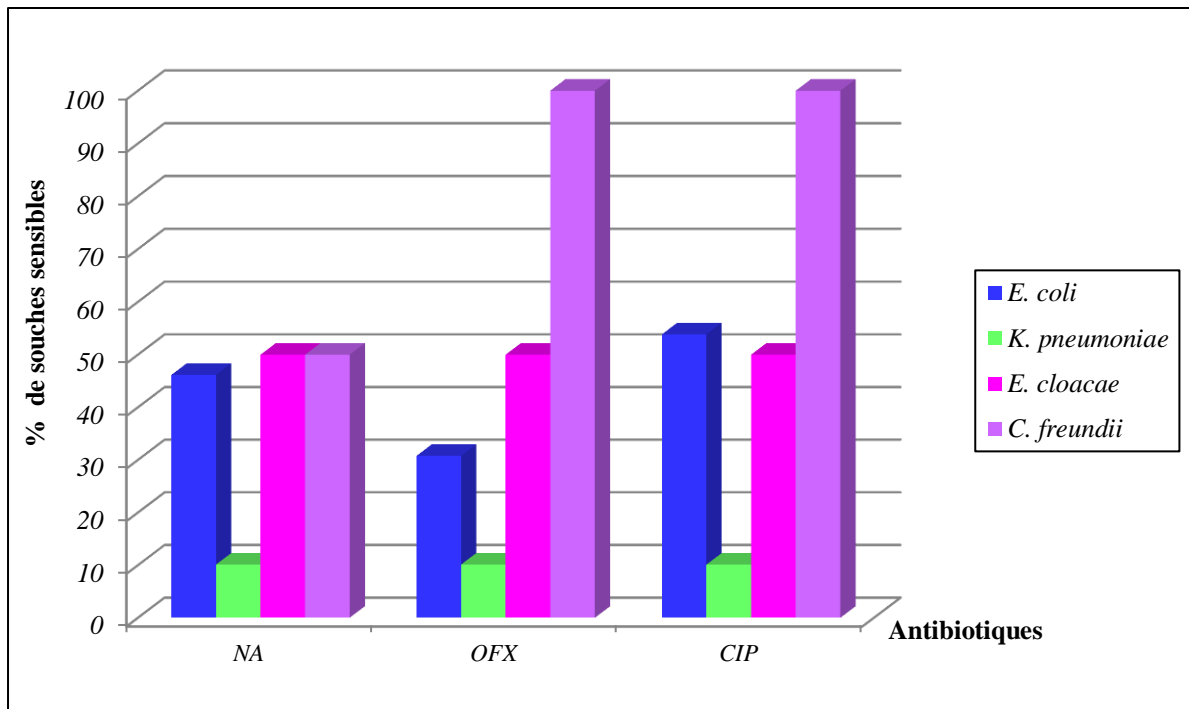


Figure N°13 : Sensibilité aux quinolones de souches entérobactéries productrices de BLSE.

3-4- Sensibilité aux autres antibiotiques :

L'étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques a révélé aussi des profils de résistance de la majorité de souches au chloramphénicol, Tétracycline, triméthoprim, l'association sulfaméthoxazole + triméthoprim et les sulfamides.

Parmi les entérobactéries productrices de BLSE, les souches de *K. pneumoniae* étaient les plus résistantes, soit 78% à la tétracycline, 89% à l'association sulfaméthoxazole + triméthoprim, et 100% pour chloramphénicol, triméthoprim, et les sulfamides (Figure N°14).

Les colistines et les fosfomycines se sont montrés les antibiotiques les plus actifs sur toutes les souches testées, soit un taux de sensibilité 100%.

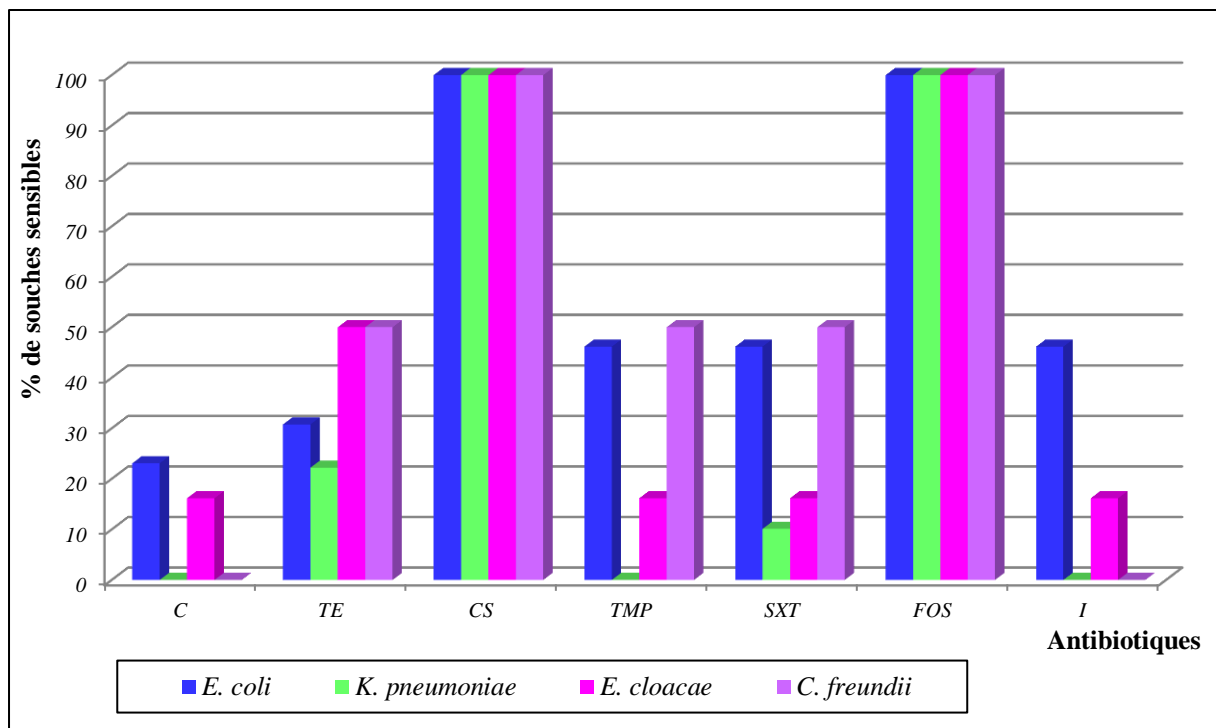


Figure N°14 : Sensibilité aux autres antibiotiques testés de souches entérobactéries productrices de BLSE.

4- Focalisation isoélectrique :

La détermination de point isoélectrique (pI) a montré que les différentes souches EBLSE analysées dans cette étude produisent en général plusieurs types de β -lactamases, où un à deux β -lactamases ont été révélés dans chaque souche. Les pIs de ces β -lactamases sont situés entre 5.4 et 8.6 (Tableau N°3).

Les β -lactamases de pI : 5.4 (TEM-1) et 7.7 (SHV-1) sont des enzymes non BLSE, produits naturellement (chromosomiques).

En effet, La plupart de souches d'entérobactéries produisent un BLSE de pI 8.6. En revanche, chez trois souches d'*E. coli*, en plus de cette BLSE produisent d'autres enzymes avec un pI 5.6 pour deux souches, et un enzyme de pI 8.2 pour une seule souche.

Les trois souches de *Klebsiella pneumoniae* (Kp6, Kp7, et Kp9) résistantes à la céfoxitine, produisent aussi un β -lactamase d'un pI de : 7.8 (Figure N°15).

L'isoélectrofocalisation est une technique d'orientation vers le type de β -lactamases analysés, mais il est difficile de déterminer avec exactitude le type de BLSE car des enzymes différentes peuvent avoir les même pIs. Pour cela, la réalisation de l'amplification par PCR et séquençage sont nécessaires.

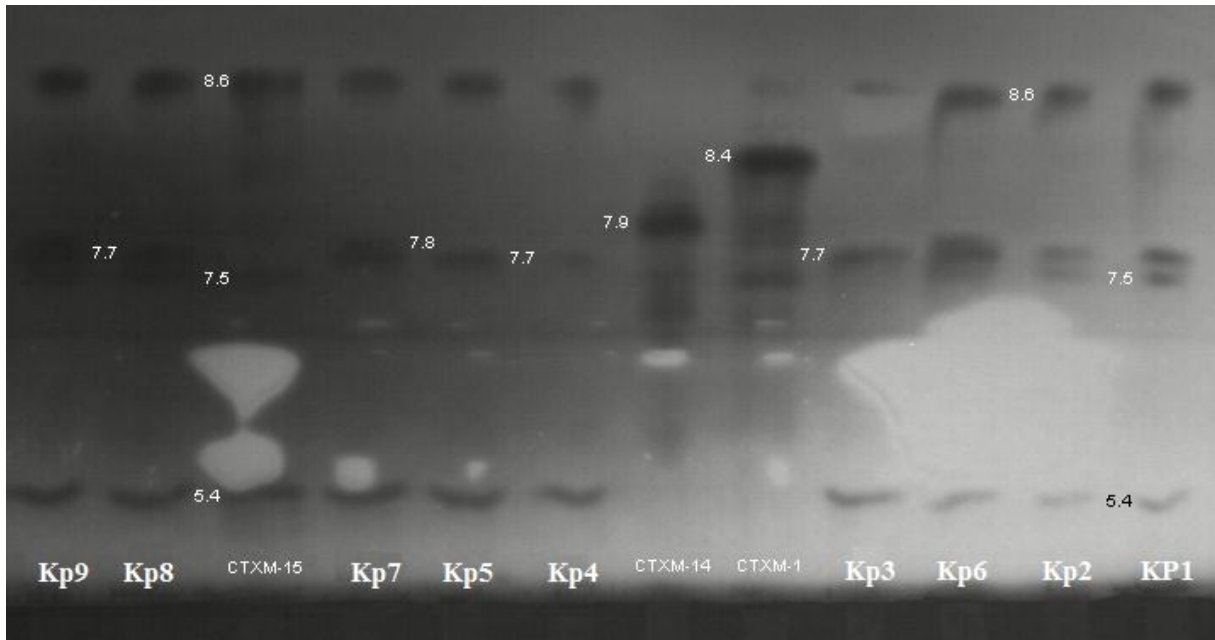


Figure N°15 : Résultat de l'isoélectrofocalisation de neuf souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE.
(CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-1: BLSE de référence)

5- Caractérisation de BLSE :

5-1- BLSE de type CTX-M :

Ce type de BLSE se reconnaît facilement sur l'antibiogramme en gélose car le CTX est habituellement la molécule la plus touchée avec une très bonne inhibition autour du disque contenant le tazobactam.

La caractérisation moléculaire de β -lactamases par PCR et séquençage a révélé que 29 souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendue provenant des patients hospitalisés aux différents services à l'hôpital, sont toutes porteuses d'un gène *bla*_{CTX-M-15} (Figure N°16), soit une prévalence de 97 %. Ce type de BLSE est fréquemment rencontré dans les hôpitaux.

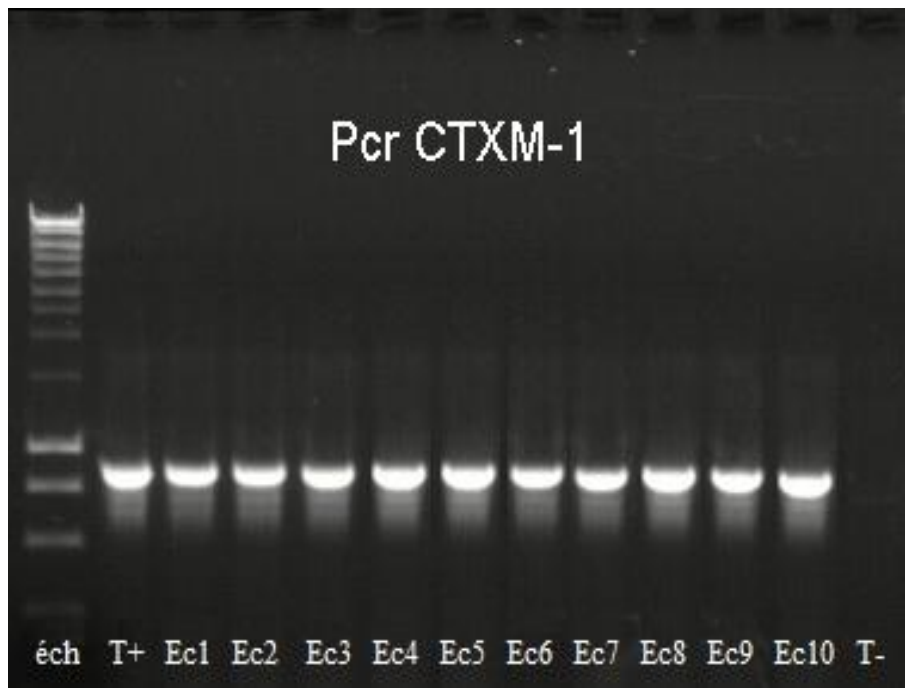


Figure N°16 : Amplification par PCR de β -lactamases CTX-M-15.
(éch : échelon ; T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif)

5-2- BLSE de type SHV :

La BLSE de type SHV-12 (correspondant au pI : 8.2) a été observée seulement chez une seule souche d'*E. coli* Ec6, isolée en 2011 dans le service de médecine femme ; soit une prévalence de 3 % (Figure N°17).

5-3- BLSE de type TEM :

Les BLSE de type TEM-4 ont été peu fréquentes, elles ont été retrouvées essentiellement chez deux souches d'*Escherichia coli* Ec11 et Ec12, et chez une seule souche de *Citrobacter freundii* Cf2, soit une prévalence de 10 %. Les trois souches ont été isolées en même l'année 2012, dans deux services différents : orthopédie et réanimation (Figure N°17).

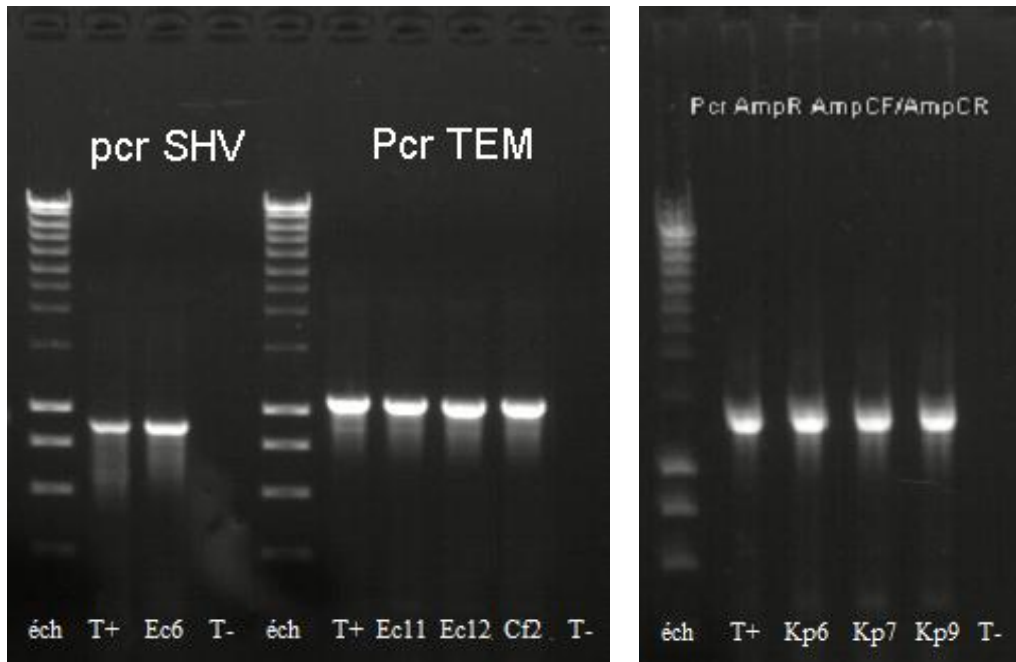


Figure N°17 : Amplification par PCR de β -lactamases SHV, TEM et DHA.
(éch : échelle de poids moléculaire; T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif)

6- Caractérisation des Céphalosporinases plasmidiques :

Parmi les 30 souches isolées, trois souches de *Klebsiella pneumoniae* Kp6, Kp7, et Kp9 ont été détectées positives pour le gène *bla_{DHA}* ; soit une prévalence de 10 %.

Le séquençage des produits de l'amplification a permis de préciser la dissémination des céphalosporinases plasmidiques AmpC de type DHA-1 chez les trois souches, isolées en 2012 à partir de deux services différents: médecine femme et réanimation (Figure N°17).

7- Typage moléculaire :

Une analyse moléculaire par ERIC-PCR a été effectuée sur toutes les souches isolées, afin de rechercher une clonalité entre les différentes souches.

7-1- *Escherichia coli* :

Selon la figure N°18, Le typage moléculaire par la technique ERIC-PCR de 13 souches d'*E. coli* a permis d'observer 11 profils différents.

Le même profil a été observé pour les deux souches Ec1 et Ec3 isolées en 2010, à partir de deux patients différents hospitalisés dans le même service de réanimation.

Cependant, le typage a permis aussi la mise en évidence d'une clonalité pour les deux souches Ec8 et Ec9 isolées en 2012, à partir de deux patients hospitalisés dans deux services différents : un dans le service de gynéco-obstétrique et l'autre dans le service de médecine femme.

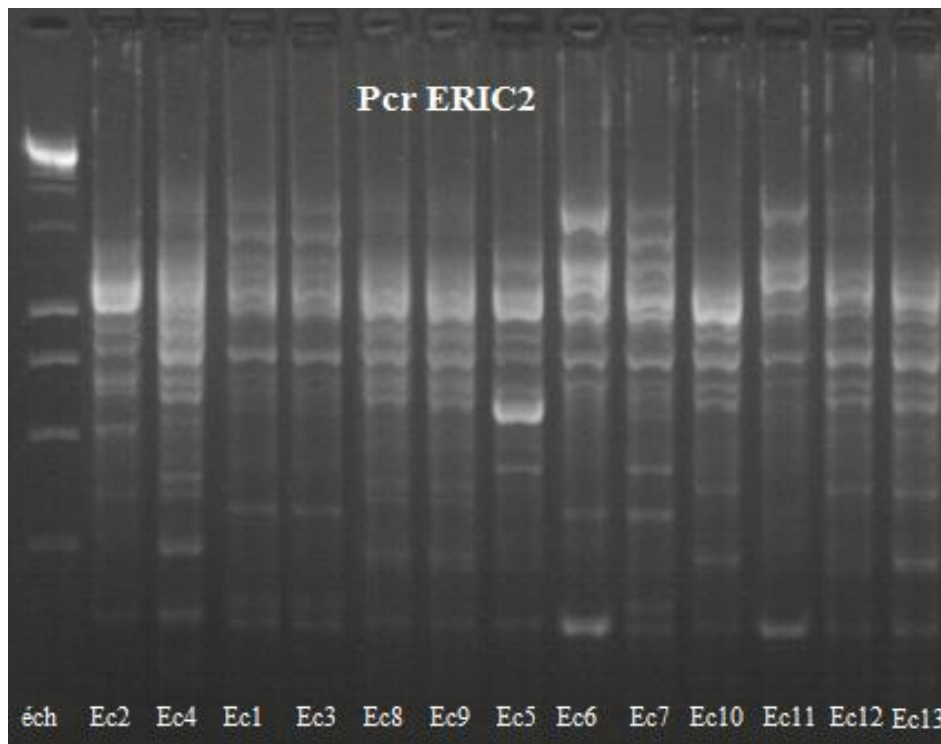


Figure N°18 : Typage moléculaire par ERIC-PCR de 13 souches d'*E. coli*.

(éch : échelle de poids moléculaire)

7-2- *Klebsiella pneumoniae* :

La technique ERIC-PCR a montré la présence de cinq profils différents chez les neuf souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Un profil était commun aux 3 souches (Kp6, Kp7, Kp9) produisant, en plus de la BLSE de type CTX-M-15, la céphalosporinase plasmidique DHA-1, suggérant un lien de clonalité (Figure N°19).

En plus, deux autres disséminations clonales ont été détectées par ERIC-PCR : souches Kp2 et Kp4, souches Kp1 et Kp8, malgré elles ont été isolées de services différents : orthopédie, réanimation et chirurgie général.

La diffusion du gène de résistance de *bla_{CTX-M-15}* s'effectuerait premièrement par les plasmides mais aussi par un transfert horizontal, une souche pouvant passer d'un patient à un autre.

7-3- *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*:

Le résultat de typage moléculaire a permis de montrer que la majorité de souches *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* sont non reliées entre elles (antibiogrammes variés, profils en typage variés) (Figure N°19).

Cette diversité génétique est due à l'absence probable de lien épidémiologique entre les souches.

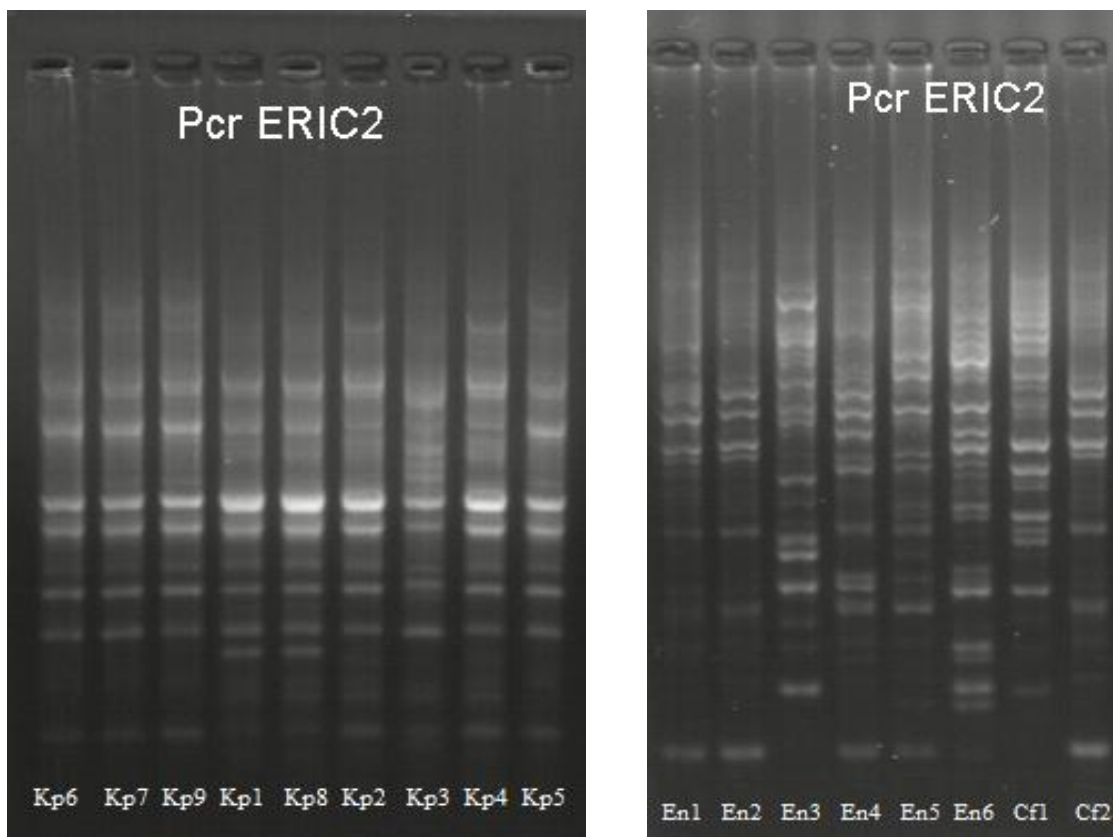


Figure N°19 : Typage moléculaire par ERIC-PCR de souches *K. pneumoniae* (à gauche), et *E. cloacae* et *C. freundii* (à droite).

8- Conjugaison :

A fin de déterminer le support génétique portant les gènes BLSE, des essais de transfert génétique par conjugaison ont été réalisés sur toutes les souches, en utilisant la souche *E. coli* C600 Rif R (résistant à la Rifampicine) comme souche réceptrice.

Au total, parmi les 30 souches productrices de BLSE, 16 transconjugants ont été obtenus (53%), qui ont montré une résistance vis à vis les céphalosporines de 3^{ème} génération avec la présence d'une synergie.

Suite à la conjugaison ; des résistances co-transférées ont été observées aux aminosides (GM/TM) chez 15 transconjugants, aux fluoroquinolones (CIP/OFX) chez 12 transconjugants, et au triméthoprime-sulfaméthoxazole et sulfamide chez 3 transconjugants de *K. pneumoniae* (TcKp6, TcKp7, TcKp9) qui ont présenté aussi d'une résistance co-transférée aux céfoxitines.

Après une analyse par isoélectrofocalisation, PCR et séquençage, il apparaît que les 16 transconjugants produisaient une BLSE de type CTX-M-15 et les trois transconjugants de *K. pneumoniae* résistantes à la céfoxitine produisaient en plus de ce type de BLSE les céphalosporinases plasmidiques DHA-1.

9- Analyse du profil plasmidique :

Parmi les 30 souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendue analysées dans cette étude, 12 souches cliniques et 4 transconjugants (TcEc1, TcEc2, TcKp3, TcEn2) ont été extraits et analysés leurs contenu plasmidique par la méthode de Kado et Liu.

Au total, l'analyse du contenu plasmidique de souches cliniques, a révélé que la majorité de souches hébergent un à quatre plasmides avec des poids moléculaires différents (Figure N°20).

Les deux souches cliniques de *K. pneumoniae* productrices de CTX-M-15 et DHA-1 ont hébergé deux plasmides différents de grande taille, dont l'un est de taille approximative de 85kb et l'autre >150 kb (Figure N°20).

Par ailleurs, l'analyse de contenu plasmidique de quatre transconjugants a montré que le gène *bla*_{CTX-M-15} était porté par un même plasmide conjugatif de grand poids moléculaire > 85 kb (environ 130kb).

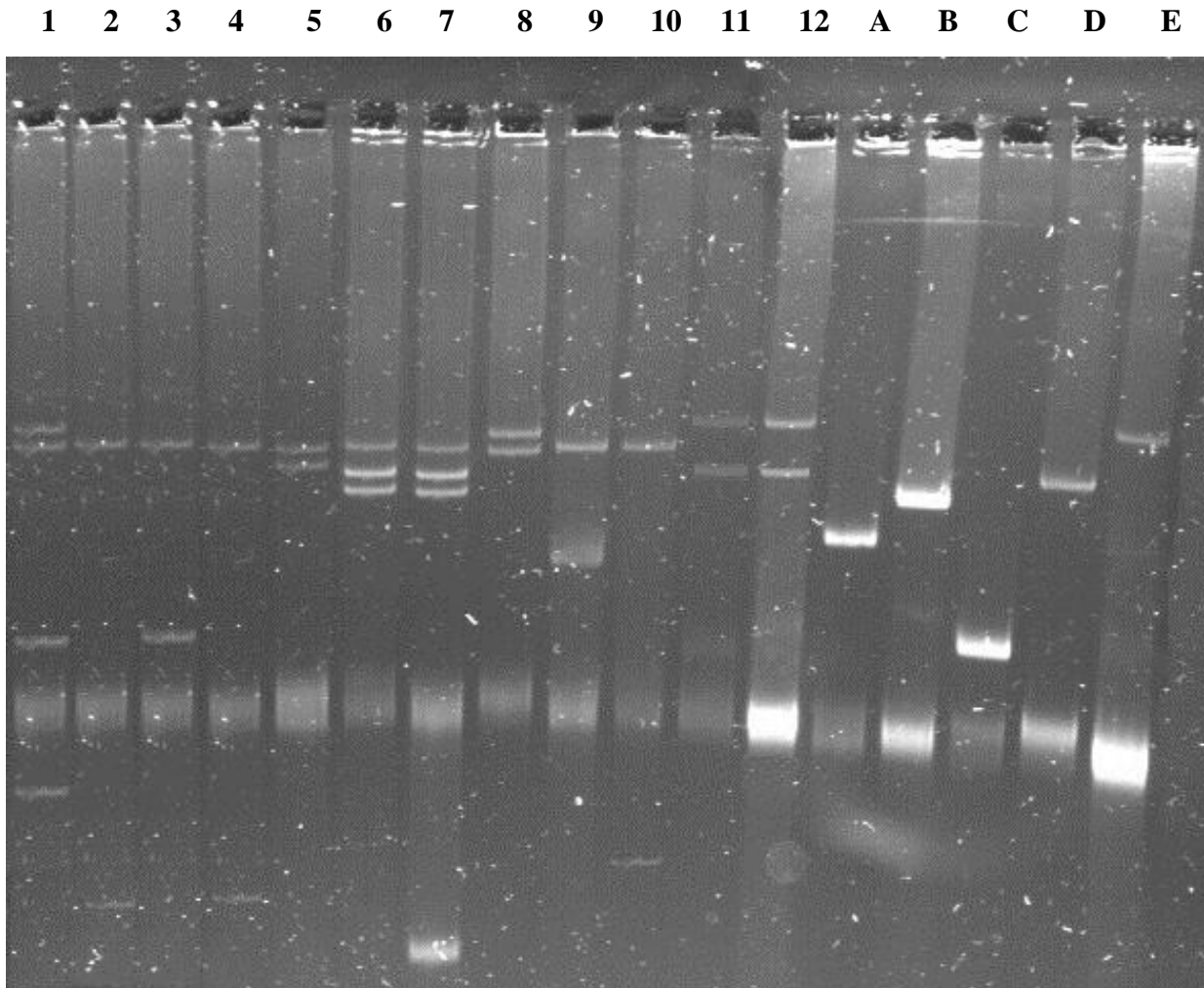


Figure N°20: Analyse de contenu plasmidique de 12 souches cliniques.

Souches cliniques : (1 : Ec1), (2 : Ec2), (3 : Ec4), (4 : Ec7), (5 : En1), (6 : En2), (7 : En5),
(8 : En6), (9 : Kp3), (10 : Kp5), (11 : Kp6), (12 : Kp7).

Marqueurs plasmidiques de PM : (A : 58 kb), (B : 61.5 kb), (C : 39 kb), (D : 85 kb),
(E : 150 kb).

Tableau N°3 : Caractéristiques générales et moléculaires de souches cliniques d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu isolées à l'hôpital de Laghouat.

Souches	Code	Date d'isolement	Service	Prélèvement	Sexe	Age (année)	pI de β -lactamases	Gènes BLSE	gènes <i>bla</i> associés	Conjugaison
<i>E. coli</i> (n = 13)	Ec1	24/01/2010	Réanimation	Cathéter	Homme	53	5.4 + 8.6	CTX-M15	-	+
	Ec2	18/04/2010	Médecine femme	urine	Femme	34	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	+
	Ec3	02/05/2010	Réanimation	Cathéter	Femme	54	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Ec4	20/02/2011	Médecine homme	urine	Homme	46	8.6	CTX-M15	-	+
	Ec5	06/03/2011	Orthopédie	urine	Homme	51	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Ec6	10/04/2011	Médecine femme	urine	Femme	32	7.5 + 8.2 + 8.6	CTX-M15, SHV-12	-	-
	Ec7	07/08/2011	Orthopédie	Pus	Homme	37	5.4 + 8.6	CTX-M15	-	+
	Ec8	08/04/2012	Gynéco-obstétrique	Rectal	Femme	49	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Ec9	22/04/2012	Médecine femme	urine	Femme	39	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Ec10	24/06/2012	Orthopédie	urine	Homme	58	8.6	CTX-M15	-	-
	Ec11	12/08/2012	Réanimation	Cathéter	Homme	56	5.6 + 8.6	CTX-M15, TEM-4	-	-
	Ec12	02/09/2012	Orthopédie	urine	Femme	52	5.6 + 7.5 + 8.6	CTX-M15, TEM-4	-	+
	Ec13	30/09/2012	Gynéco-obstétrique	urine	Femme	28	7.5 + 8.6	CTX-M15	-	+

Souches	Code	Date d'isolement	Service	Prélèvement	Sexe	Age (année)	pI de β -lactamases	Gènes BLSE	gènes <i>bla</i> associés	Conjugaison
<i>K.</i>	Kp1	13/02/2010	Orthopédie	Pus	Femme	32	5.4 + 7.5 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	+
<i>pneumoniae</i>	Kp2	19/07/2010	Orthopédie	Rectal	Femme	85	5.4 + 7.5 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	-
(n = 9)	Kp3	12/03/2011	Pneumologie	Urine	Homme	60	5.4 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	+
	Kp4	22/05/2011	Chirurgie générale	Rectal	Femme	27	5.4 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Kp5	04/09/2011	Réanimation	Rectal	Femme	49	5.4 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	+
	Kp6	04/03/2012	Médecine femme	Rectal	Femme	70	5.4 + 7.5 + 7.7 + 7.8 + 8.6	CTX-M15	DHA-1	+
	Kp7	25/04/2012	Médecine femme	pus	Femme	29	5.4 + 7.7 + 7.8 + 8.6	CTX-M15	DHA-1	+
	Kp8	07/08/2012	Réanimation	Cathéter	Homme	30	5.4 + 7.5 + 7.7 + 8.6	CTX-M15	-	-
	Kp9	29/11/2012	Réanimation	Rectal	Femme	39	5.4 + 7.5 + 7.7 + 7.8 + 8.6	CTX-M15	DHA-1	+
<i>E. cloacae</i>	En1	06/11/2011	Orthopédie	urine	Femme	57	5.4 + 7.5 + 8.6	CTX-M15	-	+
(n = 6)	En2	25/12/2011	Réanimation	Hémoculture	Femme	42	5.4 + 8.6	CTX-M15	-	+
	En3	08/01/2012	Réanimation	Pus	Homme	55	5.4 + 7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	En4	19/08/2012	Orthopédie	Cathéter	Homme	52	5.4 + 7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
	En5	25/11/2012	pédiatrie	Rectal	Femme	8 mois	5.4 + 7.5 + 8.6	CTX-M15	-	+
	En6	09/12/2012	Pneumologie	urine	Homme	56	8.6	CTX-M15	-	+
<i>C. freundii</i>	Cf1	22/01/2012	Médecine femme	urine	Femme	48	5.4 + 7.5 + 8.6	CTX-M15	-	-
(n = 2)	Cf2	12/02/2012	Orthopédie	Hémoculture	Homme	54	5.6	TEM-4	-	-

II. Discussion :

Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques. En effet, les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés (Gniadkowski. 2001).

Dans cette étude, L'incidence de souches d'entérobactéries productrices de BLSE était 7.4%, et parmi les espèces identifiées, on retrouvait majoritairement *E. coli* puis *K. pneumoniae*, *E. cloacae* et *C. freundii*.

Cette prévalence correspond à peu près à celle retrouvée dans certaines études, en particulier celle faite au Japon (6,4 %) et celle faite au Belgique (6.6%) (Luvsansharav et al. 2011, Rodriguez-Villalobos et al. 2011) ; mais assez différente de celles retrouvées dans d'autres études nationaux publiés jusqu'alors au Nord d'Algérie, où des prévalences élevées ont été rapportées, soit 39.22% à Tlemcen (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013), et 31.4% à Annaba (Nedjai et al. 2012).

Les prévalences de production de BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae* que nous avons observé dans cette étude ont été de 6.9% et 8% respectivement. Ces taux sont relativement élevés en comparaison à des fréquences de 1.3% et 5.6% respectivement trouvées par Barguigua et al. (Barguigua et al. 2011) au Maroc. Par contre, ces prévalences sont paraît être inférieures à celles rapportées dans d'autres pays à taux élevés de BLSE, comme Indonésie 18 % et 24% respectivement rapportées par Severin et al. (Severin et al. 2010), et au Mali, où 21 % et 37.8% respectivement trouvées par Duval et al. (Duval et al. 2009).

Cependant, des taux plus élevés de la prévalence de BLSE produites par le genre *Klebsiella* ont été détectés en Amérique du Sud (45,4% à 51,9 %) (Villegas et al. 2008) et en Arabie Saoudite (55%) (Al-Agamy et al. 2009). Au Iran, la prévalence des *K. pneumoniae* productrices de BLSE était très élevée soit un taux alarme 72.1% (Feizabadi et al. 2010).

Les résultats des taux d'*E. cloacae* (10.3%) productrices de BLSE que nous avons trouvé sont paraît être du même ordre de grandeur que les proportions trouvées dans les pays africains où des taux élevés de BLSE ont été rapporté, soit 18.5% au Mali (Duval et al. 2009).

Généralement, la prévalence globale de la production de BLSE a varié considérablement selon les zones géographiques des pays et dans différentes structures hospitalières.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques des trente souches étudiées montre la résistance à la plupart des β -lactamines sauf l'imipénème qui reste actif sur toutes les souches étudiées, cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multi-résistantes.

Ainsi, des résistances croisées sont observées avec les aminosides, fluoroquinolones, quinolones, et les triméthoprimes–sulfaméthoxazoles. Ceci est en rapport avec l'utilisation abusive d'antibiotiques à large spectre (pénicillines, céphalosporines, chloramphénicol, tétracyclines, fluoroquinolones, aminosides).

Récemment, un taux beaucoup plus important a été retrouvé dans une étude algérienne, où le pourcentage de la résistance de souches EBLSE était 100% à la majorité des antibiotiques C3G testés, gentamicine et tobramycine (Touati et al. 2012).

De même, les proportions retrouvées par Ben Haj Khalifa et Khedher dans une étude portant sur les *Klebsiella spp.* uropathogène productrices des BLSE isolées à l'hôpital universitaire Tunisien, sont plus proches de celles que nous observons dont la fréquence de la résistance de ces germes est estimée à 100% aux céphalosporines de 3^{ème} génération, 92.5% aux gentamicines, et 67.5% aux fluoroquinolones (Ben Haj Khalifa et Khedher. 2012).

Il est actuellement prouvé que l'utilisation des antibiotiques, notamment les céphalosporines de 3^{ème} génération dans un but thérapeutique est le facteur de risque le plus important dans le développement de résistances bactériennes (Rubin et Samore. 2002), est devenue un problème majeur de santé public.

Le séquençage des produits PCR de 30 souches d'entérobactéries isolées à l'Hôpital de Laghouat a permis de mettre en évidence la production de trois types de BLSE, avec une nette prédominance de BLSE de type CTX-M, en particulier les CTX-M-15, soit 97%.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par de précédentes études réalisées en Algérie (Iabadene et al. 2009 ; Nedjai et al. 2012 ; Touati et al. 2010 ; Touati et al. 2012), en Tunisie (Elhani et al. 2011), Maroc (Barguigua et al. 2011), Nigéria (Olowe et al. 2010), Mali (Duval et al. 2009), Portugal (Mendonça et al. 2009), Chine (Liu et al. 2009), Taiwan (Shu et al. 2010) et aux nombreuses pays de monde.

En effet, des études relatives à la prévalence et à la diversité des BLSE des entérobactéries isolées en Algérie ont montré aussi la présence du gène *bla*_{CTX-M-3} (Gharout-Sait et al. 2012 ; Iabadene et al. 2008 ; Messai et al. 2008 ; Ramdani-Bougoussa et al. 2006 ; Ramdani-Bougoussa et al. 2011 ; Touati et al. 2006).

Les autres BLSE retrouvées dans la présente étude sont des SHV-12 (3%) chez une seule souche d'*E. coli*, et trois TEM-4 (10%) ont été retrouvées chez les souches *E. coli* et *Citrobacter freundii*.

De même, en Algérie, les BLSE de type TEM-4 sont très rarement trouvées ; ce qui était démontré dans l'étude de Kermas et al, où ce type de BLSE a été détecté chez trois souches de *Salmonella enterica* isolées de l'Hôpital Hussein Dey à Alger (Kermas et al. 2012).

Néanmoins, la BLSE SHV-12 a été déjà mis en évidence dans notre pays, par beaucoup des travaux, chez les espèces *K. pneumoniae* (Berrazeg et al. 2013), et *E. cloacae* (Iabadene et al. 2008 ; Labid et al. 2014). Ce type de BLSE a été isolé pour la première fois en 1997 en Suisse chez une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un patient venant de l'Afrique du Nord (Nüesch-Inderbinen et al. 1997).

Durant les trois années incluses dans l'étude, les souches EBLSE ont été retrouvées dans tous les types de services. Cependant, certaines spécialités sont apparues plus concernées, services : d'orthopédie, de réanimation et de médecine femme. Dans ces services, les bactéries sont soumises à une pression élevée des antibiotiques. Bien plus, plusieurs de ces patients sont particulièrement vulnérables aux infections suite à une hospitalisation prolongée et après exposition à des dispositifs invasifs (sonde urinaire, cathéters veineux, ou tube endotrachéal). En effet, les patients hospitalisés au sein des unités de soins intensifs présentent plus de risques à contracter une BLSE (Stürenburg et Dietrich. 2003).

En général, les services de réanimation ont considéré fréquemment comme des foyers d'origine pour la dissémination des bactéries productrices de BLSE en causant de nombreuses épidémies au niveau local et international (Rodriguez-Villalobos et Struelens. 2006).

En effet, on constate un nombre significativement plus important des prélèvements recensés des urines (40%) chez les patients hospitalisés. Ce résultat corrobore ceux de Bermudes et al. et de Canton et al. qui rapportent que la majorité des souches BLSE proviennent de l'urine (Bermudes et al. 1997 ; Canton et al. 2008).

Dans notre étude, le sexe féminin (60 %) était retrouvé comme facteur de risque. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Nedjai et al (Nedjai et al. 2012) et Rodriguez-Bano et al (Rodriguez-Bano et al. 2008b). Néanmoins, d'autres études ont conclu à un risque plus élevé pour les hommes (Colodner et al. 2004 ; Gupta et Datta. 2007).

De plus, dans la population étudiée, seuls trois des 30 patients admis, soit 10%, avaient porteurs d'EBLSE importée. Ce taux reste faible par rapport à ce rapporté dans une étude cas témoin effectuée sur une durée de six ans à Nantes, Bourigault et al. mettaient en évidence que environ de 40 % des souches d'EBLSE étaient retrouvées dans des prélèvements cliniques réalisés moins de 48 heures après l'admission (Bourigault et al. 2012).

Pour cela, les circulations inter- et intra-hospitalières des patients porteurs d'EBLSE, ainsi que la fréquence de leurs séjours hospitaliers préalables à l'isolement des EBLSE, apparaissent importantes et constituent des facteurs qui prédisposent à l'acquisition des bactéries multi-résistantes (Ahoyo et al. 2007).

D'une manière générale, l'ensemble des données épidémiologiques de notre étude va dans le sens d'une augmentation de la prévalence des EBLSE. Les principaux facteurs de risque associés seraient les infections urinaires répétées, âge, transferts d'autres établissements, hospitalisations récentes, dispositifs invasifs, sexe féminin, la prise d'antibiotiques, en particulier de céphalosporines, aminosides et de fluoroquinolones ainsi qu'un antécédent d'hospitalisation.

Selon une étude recherchant les facteurs de risque d'infection par *E. coli* BLSE, a montré que l'âge supérieur à 60 ans, le sexe féminin, le diabète, une infection urinaire récente, le caractère nosocomial de l'infection et l'antibiothérapie par aminopénicillines, céphalosporines et fluoroquinolones étaient des facteurs de risque d'infection à *E. coli* BLSE (Rodriguez-Bano et al. 2008a). De même, une étude réalisée par Harris et al. (Harris et al. 2007), a montré quatre facteurs de risques associés au portage d'EBLSE étaient mis en évidence chez les patients admis en réanimation à l'université du Maryland, qui sont: une prescription préalable de pipéracilline-tazobactam, de vancomycine, un âge supérieur à 60 ans et une maladie chronique.

Dans notre étude, le phénotype de résistance céphalosporinase de haut niveau est caractérisé chez trois souches de *Klebsiella pneumoniae*, productrices de BLSE et résistantes au même temps au céfoxitine, soit deux souches (Kp6, Kp7) ont été isolées dans le service de Médecine femme, et une souche (Kp9) a isolée dans le service de réanimation.

En revanche, d'autres études réalisées en Espagne, la Chine, et la France, ont montré les mêmes données, où il y a la diffusion des céphalosporinases plasmidiques DHA-1 associés avec les mécanismes de production de β -lactamases à spectre étendue BLSE chez les souches de *Klebsiella pneumoniae* (Guo et al. 2012 ; Hennequin et al. 2012 ; Tobes et al. 2013).

Ces enzymes ont été plus récemment individualisées chez des entérobactéries comme *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* ou *Salmonella* spp. Ces céphalosporinases plasmidiques sont très proches génétiquement des céphalosporinases AmpC chromosomiques et le transfert des gènes codant les céphalosporinases sur les plasmides implique des éléments génétiques mobiles (Bush et al. 1995 ; Philippon et al. 2002).

Généralement, les gènes codant les enzymes AmpC sont localisés sur des plasmides dont la taille varie de 7 à 180 kb (Philippon et al. 2002). Selon Corvec et al., ont rapporté dans leur étude un plasmide d'environ 170kb comme support génétique de gène *bla*_{DHA-1} associé avec trois autres gènes de *qnrB4*, *aac(6)'Ib-cr* et *bla*_{SHV-2a} (Corvec et al. 2009)

Malheureusement, peu d'études en Algérie permettent de connaître la prévalence des céphalosporinases de type ampC chez cette espèce. Cependant, une étude a été réalisée sur trois hôpitaux d'Alger, où il y'a la détection de production des céphalosporinases type CMY-2 chez des souches de *Klebsiella pneumoniae*, et le DHA-1 a été détecté dans la souche d'*Enterobacter cloacae* (Iabadene et al. 2009).

Ce type de souche n'avait jusqu'à maintenant, jamais été décrit dans notre laboratoire à Laghouat, ni dans la plupart des laboratoires hospitaliers de notre pays l'Algérie. Donc, c'est la première détection de DHA-1 chez les souches *Klebsiella pneumoniae*.

Le typage moléculaire de trente souches par ERIC-PCR, a montré une diversité génétique de souches impliquées dans les différentes infections à entérobactéries productrices de BLSE survenues dans notre hôpital; soit 11 profils différents parmi les 13 souches d'*E. coli* et 5 profils différents parmi les 9 souches de *Klebsiella pneumoniae*. De même, toutes les souches

d'*Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* sont non reliées entre elles. Cette non-clonalité permet d'évoquer la transmission horizontale d'un plasmide.

De plus, nous avons remarqué pour les souches *Klebsiella pneumoniae*, que le typage par ERIC-PCR a montré un seul profil pour les trois souches productrices des CTX-M-15 et DHA-1, ceci suggère que la diffusion de DHA-1 serait le résultat d'une propagation d'un seul clone entre les patients hospitalisés dans les deux services : Médecine femme et Réanimation, à cause d'une transmission manuelle possible ou manque d'hygiène à l'hôpital.

Généralement, les gènes codant pour les BLSE sont portés par des plasmides transférables de grande taille (30 - 300 Kb) (Elhani. 2012), sur lesquels l'émergence de l'enzyme CTX-M-15 s'explique par la diffusion d'un plasmide conjugatif porteur du gène *bla*_{CTX-M-15} chez des entérobactéries de différents groupes phylogéniques. Cela est confirmé dans notre étude par les résultats de l'analyse plasmidique réalisée qui a démontré que les plasmides portant le gène *bla*_{CTX-M-15} est porté par un grand plasmide, de poids moléculaire supérieur à 85 Kb.

Par ailleurs, plusieurs études ont été décrit que le gène *bla*_{CTX-M-15} a porté par des plasmides transférables. Une étude réalisée en Espagne a montré que le gène *bla*_{CTX-M-15} est porté par un plasmide d'une taille de 180kb (Valverde et al. 2008). Par contre, dans d'autre étude, la taille de plasmide était 150kb, sur lesquels il est associé à des gènes codant pour la résistance aux aminosides (Mesko et al. 2009).

Nos Transconjugants présentent un phénotype BLSE type CTX-15 avec une résistance associée aux aminosides, fluoroquinolones, triméthoprim-sulfaméthoxazole et sulfamide. Cette notion de multi-résistance de BLSE isolés dans notre étude a déjà été décrite où ils sont souvent associés à des gènes codant pour la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprim, aux cyclines et aux fluoroquinolones (De Champs et al. 1991). Cela, Elle pourrait être expliquée par l'association des gènes codant pour les CTX-M avec des éléments mobiles comme les séquences d'insertions ISEcp1 qui permettent l'acquisition de nombreux gènes de résistances (Boyd et al. 2004 ; Eckert et al. 2006).

De nombreuses études décrites en Algérie ont montré des associations entre la *bla*_{CTX-M-15} et le gène *qnrB1* ou *S1* (Messai et al. 2008 ; Touati et al. 2008), et la *bla*_{SHV-12} avec les gènes *qnr* *S1* et *B4* exprimant à la fois dans un clone d'*Enterobacter cloacae* (Iabadene et al. 2008).

Récemment, en 2013, Baba Ahmed-Kazi Tani et al. ont rapporté la présence des associations entre le gène *bla*_{CTX-M-15} et des gènes de résistance aux aminosides *aac(3')-II*, aminosides-quinolones *aac(6')-Ib-cr*, *qnrB2*, sulfamides *sul1* et *sul2* et les gènes cassettes *aadA2*, *dfrA1* et *dfrA12* (Baba Ahmed-Kazi Tani et al. 2013). Les mêmes auteurs ont individualisé deux types de populations de l'enzyme CTX-M-15 en Algérie selon la caractérisation de la séquence *spacer* entre *ISEcp1* et *bla*_{CTX-M-15}: Une qui dérive du CTX-M-3 sous un contexte clinique algérien et une qui est universellement trouvée.

A la fin, on peut conclure que les souches isolées dans cette étude durant la période 2010 – 2012, sont d'apparition récente dans notre Hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat et sont à considérer comme un problème émergent du fait de leur association constante aux β -lactamases à spectre étendu et aux céphalosporinases plasmidiques, rendant difficile le traitement de ces patients hospitalisés.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail, réalisé de façon rétrospective sur une période de trois ans : 2010 – 2012, avait pour objectif de définir le profil épidémiologique et moléculaire de souches isolées des patients hospitalisés aux différents services dans l'Hôpital « Ahemida Ben Adjila » de Laghouat, Algérie,

Cette étude est la première à notre connaissance qui porte sur l'émergence des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) dans la région de Laghouat jusque là relativement épargnée par ce phénomène, où la prévalence de ces souches semble augmentée d'année en année.

Pendant les 3 ans d'étude, 405 souches d'entérobactéries ont été identifiées au laboratoire de bactériologie médicale à l'Hôpital de Laghouat. La prévalence des entérobactéries productrices de BLSE est assez importante en milieu hospitalier, soit 7.4% ; avec une prédominance de souches *Escherichia coli* (43%), suivis *Klebsiella pneumoniae* (30%), *Enterobacter cloacae* (20%), et *Citrobacter freundii* (7%). Les entérobactéries productrices de BLSE sont très dispersées dans le temps et les services.

De plus, la majorité de ces souches EBLSE présentent des niveaux de résistance élevés, à la plupart des β -lactamines sauf l'imipénème qui reste actif sur toutes les souches étudiées. En revanche, il est à noter des co-résistances fréquentes ont remarqué aux aminosides, fluoroquinolones, quinolones et au triméthoprime–sulfaméthoxazole.

Cependant, la plupart des patients identifiés comme porteurs d'EBLSE dans l'Hôpital présentent certains facteurs de risque, qui sont: sexe Féminin, l'âge, les sondes urinaires, transferts d'autres établissements, long durée de l'hospitalisation, dispositifs invasifs, et antibiothérapie préalable. De plus, on constate trois services de risque dans l'Hôpital de Laghouat, sont : service d'Orthopédie, Réanimation et Médecine femme, qui sont considérés comme des réservoirs de souches multi-résistantes.

La caractérisation de BLSE a montré la prédominance des enzymes CTX-M-15 chez 97% de souches étudiées, suivis par d'autres types différents de BLSE que nous avons aussi mis en évidence, qui sont SHV-12 et TEM-4.

Pour la première fois, en Algérie, nous rapportons l'émergence de souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de céphalosporinase plasmidique de type DHA-1 dans l'Hôpital, avec une prévalence de 10%.

L'étude épidémiologique moléculaire a permis de mettre en évidence d'une diversité génétique de souches productrices de BLSE, cela suggérant probablement, d'une part, à une circulation et une dissémination par transfert horizontal d'un plasmide conjugatif, support de gène *bla*_{CTX-M-15} de grand poids moléculaire dépassant les 85 kb; et d'autre part, une persistance de quelques souches clonales qui circulaient entre services.

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

En conclusion, la diffusion de souches multi-résistantes, d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinase plasmidique dans nos hôpitaux constitue une menace de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères.

Pour cela, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux. La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de souches multi-résistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de santé concernés (Médecins cliniciens, Infectiologues, Bactériologistes, Hygiénistes, Personnels soignants...).

Des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes, on note : L'hygiène des mains, tenue de protection, port de gants, gestion du matériel et des surfaces souillées, circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques, la détection précoce des porteurs lors de leur admission à l'hôpital et le renforcement des mesures d'hygiène autour des patients porteurs (application des précautions contact).

En fin, la lutte contre l'émergence et la diffusion de ces souches multi-résistantes aux antibiotiques passe enfin par une meilleure et moindre utilisation des antibiotiques. En effet, une politique d'antibiothérapie justifiée et/ou d'une restriction dans la prescription des céphalosporines de troisième génération et même de toutes les céphalosporines conduisent à une diminution significative de la fréquence de BLSE. De telles directives ne sont pas encore en vigueur au Laghouat.

Références Bibliographiques

- Abbott, S.L. 2007. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM press. 9: 698-715.
- Abraham, E.P., and Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837.
- Ahoyo, A.T., Baba-Moussa, L., Anago, A.E., Avogbe, P., Missihoun, T.D., Loko, F, Prévost, G., Sanni, A., and Dramane, K. 2007. Incidence of infections dues to *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamase, in the Zou/Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin. *Médecine et maladies infectieuses*. 37 : 746–752.
- Al-Agamy, M.H., Shibl, A.M., and Tawfik, A.F. 2009. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Ann Saudi Med*. 29(4): 253-257.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci*. 289: 321-331.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F.W., Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, A., and Waley, S.G. 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J*. 276: 269-270.
- Arlet, G., and Philippon, A. 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab*. 352 : 41-55.
- Arlet, G., Sanson-le-Pors, M.J., Rouveau, M., Fournier, G., Marie, O., Schlemmer, B., and Philippon, A. 1990. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 9(11): 797-803.
- Arpin, C., Coulange, L., Dubois, V., André, C., Fischer, I., Fourmaux, S. Grobost, F., Jullin, J., Dutilh, B., Couture, J.F., Noury, P., Lagrange, I., Ducastaing, A., Doermann, H.P., and Quentin, C. 2007. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51: 3440–3444.
- Asensio, A., Oliver, A., Gonzalez-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., Ros, P., Cobo, J., Palacios, M., Lasheras, D., and Canton, R. 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis*. 30: 55–60.
- Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H. 2000. Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition : 171-211.
- 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). *Microbial Drug Resistance*. 19(3): 185-190.

- Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W.J., and Morrow, J.E. 1978. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl Environ Microbiol*. 36: 178-185.
- Bando, K., Muto, Y., Watanabe, K., Katoh, N., and Ueno, K. 1991. Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35(2): 371-372.
- Baraduc, R., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., Jallat, C., Joly, B., and Livrelly, D. 2000. *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. Précis de bactériologie clinique. Editions ESKA: 1115-1126.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Bourjilat, F., Haouzane, F., Zerouali, K., and Timinoumi, M. 2011. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from community in Morocco. *J Med Microbiol*. 60: 1344-1352.
- Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A. 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC inductible plasmidique β -lactamase (DHA-1) avec un *ampR* gène de *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42: 2352-2358.
- Barrial, K., and Scotet, J. 2006. Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud de bactériologie*. 3-10.
- Bebrone, C. 2007. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*. 74: 1686-701.
- Ben Haj Khalifa, A., and Khedher, M. 2012. Epidémiologie des souches de *Klebsiella spp.* uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire Tunisien, 2009. *Pathol Biol (Paris)*. 60(2): e1–e5.
- Ben Redjeb, S., Ben Hassen, A., Hammami, A., and Kechrid, A. 2000. Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie. "Résistance aux antibiotiques". *Press. Méd.* 1-5.
- Bermudes, H., Arpin, C., Jude, F., Elharrif, Z., Bebear, C., and Quentin, C. 1997. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteria in a French hospital. *Klebsiella pneumoniae Resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Dis.* 523-529.
- Berrazeg, M., Drissi, M., Medjahed, L., and Rolain, J.M. 2013. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J. Med. Microbiol*.
- Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J.P., Bert, F., Moreau, R., and Nicolas-Chanoine, M.H. 2011. In vitro selection of ram R and sox R mutants overexpressing

efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (6): 2795–2802.

- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1–14.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Viillard, J.L., Labia, R., and Sirot, J. 2000a. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3061–3068.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., and Sirot, J. 2000b. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in céfotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1936–1942.
- Bourigault, C., Corvec, S., Bemmer, P., Juvin, M.E., Guillouzouic, A., Crémet, L., Reynaud, A., Leprince, C., and Lepelletier, D. 2012. Impact de l'augmentation de l'incidence des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) sur l'application des précautions complémentaires dans un centre hospitalier universitaire. *Pathol Biol (Paris)* : 1-6.
- Boyd, D.A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M.P., Willey, B.M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., and Mulvey, M.R. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3758– 3764.
- Bradford, P.A. 1999. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla_{SHV}* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2960-2963.
- Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933-51.
- Brisse, S., and Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 915-924.
- Bryskier, A. 1999. Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses Ed. Paris. 747.
- Bush, K. 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 32: 1085-1089.

- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(6): 1211-1233.
- CA-SFM. 2010. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2010. Société Française de Microbiologie, Paris, France: <http://www.sfm.asso.fr>
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., and Coque, T.M. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eur Soc Clin Microbiol Infect.* 14: 144–153.
- Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. 2004. Bêtalactamines. EMC-*Maladies infectieuses.* 1: 129-202.
- Charlier, P., Coyette, J., Dehareng, D., Dive, G., Duez, C., Dusart, J., Fonzé, E., Fraipont, C., Frère, J.M., Galleni, M., Goffin, C., Joris, B., Lamotte-Brasseur, J., and Nguyen-Distèche, M. 1998. Résistance bactérienne aux β -lactamines. Synthèse. médecine/sciences. 14 : 544-555.
- 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.
- Chopra, I., O'Neill, A., and Miller, K. 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates.* 6: 137-145.
- Chow, J.W., Fine, M.J., Shlaes, D.M., Quinn, J.P., Hooper, D.C., Johnson, M.P., Ramphal, R., Wagener, M.M., Miyashiro, D.K., and Yu, V.L. 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med.* 115(8): 585-590.
- Chung, K.I., Lim, T.H., Koh, Y., Song, J.H., Kim, W.S., Choi, J., and Mand Aush, Y.H. 1992. Nosocomial pneumonia in medico-surgical intensive care unit. *J Korean Med Sci.* 7: 241-251.
- Colodner, R., Rock, W., Chazan, B., Keller, N., Guy, N., Sakran, W., and Raz, R. 2004. Risk Factors for development of Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Bacteria in Nonhospitalized Patients. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 23: 163-167.
- Coque, T., Baquerot, F., and Canton, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL – producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance.* 13(47): 1–11.
- Corvec, S., Crémet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Le Floch, R., Reynauda, A., Lepelletiera, D., and Bémera, P. 2009. *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate coproducing SHV-2a, DHA-1, QnrB4, and AAC(6')-IB-cr determinants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64(4): 462-463.

- Datta, N., and Kontomichalou, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208: 239-241.
- Davies, J. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *207*:15-27.
- Dbaibo, G.S. 2000. Old and new targets of antibacterial therapy. *Leb Med J.* 48: 177-181.
- De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, M.C., Dumas, M.P., and Sirot, J. 1991. Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *J Antimicrobial Chemother.* 27: 441-447.
- Decousser, J.W., Poirel, L., and Nordmann, P. 2001. "Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12): 3595-3598.
- Doran, T.I. 1999. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. Review. *Clin Infect Dis.* 28(2): 384-394.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., and Jarlier, V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 14: 90-103.
- Dumarche, P., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., and Sirot, J. 2002. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1128-1131.
- Duval, V., Maiga, I., Maiga, A., Guillard, T., Brasme, L., Forte, D., Madoux, J., Vernet-Garnier, V., and De Champs, C. 2009. High prevalence of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bamako, Mali. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(11): 4957-4958.
- Eckert, C., Gautier, V., and Arlet, G. 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother.* 57: 14-23.
- Elhani, D. 2012. Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Ann Biol Clin.* 70(2). 117-40.
- Elhani, D., Bakir, L., and Aouni, M. 2011. The changing epidemiology of extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Biol Clin.* 69(5): 523-529.
- 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.

- Faruki, H., and Sparling, P.F. 1986. Genetics of resistance in a non β -lactamase-producing gonococcus with relatively high-level penicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30(6): 856-860.
- Feizabadi, M.M., Mahamadi-Yeganeh, S., Mirsalehian, A., Mirafshar, S.M., Mahboobi, M., Nili, F., and Yadegarinia, D. 2010. Genetic characterization of ESBL producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. *J Infect Dev Ctries.* 4: 609-615.
- 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.
- Follath, F., Costa, E., Thommen, A., Frei, R., Burdeska, A., and Meyer, J. 1987. Clinical consequences of development of resistance to third generation cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol.* 6(4): 446-450.
- Fortineau, N., Poirel, L., and Nordmann, P. 2001. plasmidique et inductible céphalosporinase DHA-2 de *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 47: 207-210.
- Gaillot, O., Clément, C., Simonet, M., and Philippon, A. 1997. Novel transférables β -lactame avec des caractéristiques de résistance céphalosporinase à *Salmonella enteritidis*. *J Antimicrob Chemother.* 39: 85-87.
- Georgopapadakou, N.H. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2045-2053.
- Gharout-Sait A., Touati A., Benallaoua S., Guillard T., Brasme L., Madoux J., and de Champs C. 2012. CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 5306-5313.
- Ghuysen, J.M. 1990. Membrane topology, structure, and functions of the penicillin-interactive proteins. *Biotechnol Appl Biochem.* 12: 468-72.
- Ghuysen, J.M. 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* 45: 37-67.
- Gniadkowski, M. 2001. Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clin. microbial infect.* 7: 557 -608.
- Goldstein, F.W., Pean, Y., and Gertner, J. 1995. Resistance to ceftriaxone and other beta-lactams in bacteria isolated in the community. The Vigil'Roc Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(11): 2516-2519.
- Gootz, T.D. 1990. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1): 13-31.

- Guo, Q., Wang, P., Ma, Y., Yang, Y., Ye, X., Wang, M. 2012. Co-production of SFO-1 and DHA-1 β -lactamases and 16S rRNA methylase ArmA in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 67(10): 2361-2366.
- Gupta, V., and Datta, P. 2007. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in community isolates from North India: frequency and predisposing factors. *Int J Infect Dis.* 11: 88-89.
- Haeggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., and Brisse, S. 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2400-2408.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., and Akalin, H.E. 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(8): 1637-1644.
- Hammond, D.S., Schooneveldt, J.M., Nimmo, G.R., Huygens, F., and Giffard, P.M. 2005. *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 256-263.
- Hanson, N.D. 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother.* 52: 2-4.
- Harder, K.J., Nikaido, H., and Matsushashi, M. 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain β -lactams compounds lack the OmpF porin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20(4): 549-552.
- Hardman, J.G., and Limbird, L.E. 1998. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9th edition. Nieuwegein, Pays-Bas, Mc Graw-Hill. 1069-1098.
- Harris, A.D., Kotetishvili, M., Shurland, S., Johnson, J.A., Morris, J.G., Nemoy, L.L., and Johnson, J.K. 2007. How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control.* 35(2): 97-101.
- 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.
- Hennequin, C., Robin, F., Cabrolier, N., Bonnet, R., and Forestier, C. 2012. Characterization of a DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(1): 288-294.
- Holmes, B., and Aucken, H.M. 1998. *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia* and other members of the Enterobacteriaceae. Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology. London Arnold. 9th ed: 999-1033.

- Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., and Philippon, A. 2002. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3045-9.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Alouache, S., Verdet, C., Bakour, R., and Arlet, G. 2009. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34: 340-342.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R., and Arlet, G. 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 133-136.
- Jacobson, K.L., Cohen, S.H., Inciardi, J.F., King, J.H., Lippert, W.E., Iglesias, T., and Van Couwenberghe, C.J. 1995. The relationship between antecedent antibiotic use and resistance to extended-spectrum cephalosporins in group I beta-lactamase-producing organisms. *Clin Infect Dis.* 21(5): 1107-1113.
- Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1697-1704.
- Jacoby, G.A., and Munoz-Price, L.S. 2005. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 352: 380-391
- Jaffe, A., Chabbert, Y.A., and Semonin, O. 1982. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22(6): 942-948.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. 2006. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria. Washington, USA: *ASM Press*: 115-129.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. 1988. Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 10: 867-878.
- Jauregui, F. 2009. Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Med Sci, Paris.* 25(3): 221-223.
- Jaurin, B., and Grundstrom, T. 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K₁₂ has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 78(8): 4897-4901.
- Kado, C.I., and Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Kassis-Chikhani, N., Vimont, S., Asselat, K., Trivalle, C., Minassian, B., Sengelin, C., Gautier, V., Mathieu, D., Dussaix, E., and Arlet, G. 2004. CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in longterm care facilities, France. *Emerg Infect Dis.* 10: 1697-1698.

- Kermas, R., Touati, A., Brasme, L., Le Magrex-Debar, E., Mehrane, S., Weill, F.X., and De, C.C. 2012. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey hospital in Algiers (Algeria). *Foodborne. Pathog. Dis.* 9: 803-808.
- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., and Wiedermann, B. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 302-307.
- Knirel, Y.A., Kocharova, N.A., Bystrova, O.V., Katzenellenbogen, E., and Gamian, A. 2002. Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus *Citrobacter*. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis.* 50: 379-391.
- Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and Mitsuhashi, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *J Infect.* 11:315-317.
- Knox, J.R. 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(12): 2593-2601.
- Kumar, A., and Schweizer, H.P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev.* 57: 1486-1513.
- Labid, A., Gacemi-Kirane, D., Timinouni, M., Amoura, K., and Rolain, J.M. 2014. High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(9): 947-954.
- Laupland, K.B., Church, D.L., Vidakovich, J., Mucenski, M., and Pitout, J. 2008. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J Infect.* 5: 20-26.
- Lautenbach, E., Patel, J.B., Bilker, W.B., Edelstein, P.H., and Fishman, N.O. 2001. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect.* 32: 1162–1171.
- Le Noc, P. 1999. Monobactames in Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. *Ed Ellipses.* 374-391.
- Limbert, M., Isert, D., Klesel, N., Markus, A., Seeger, K., and Seibert, G. 1991. Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of Cefquinome (HR111V), a new broad spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(1) : 14-19.
- Liu, W., Chen, L., Li, H., Duan, H., Zhang, Y., Liang, X., Li, X., Zou, M., Xu, L., and Hawkey, P.M. 2009. Novel CTX-M {beta}-lactamase genotype distribution and spread into

multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China. *J Antimicrob Chemother.* 63: 895-900.

- Livemore, D.M. 1988. Permeation of β -lactams antibiotics into *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and other gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis.* 10(4): 691-698.
- Livermore, D.M. 1995. "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clin Microbiol Rev.* 8(4): 557-584.
- Livermore, DM. 2003. "Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact," An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 36(1): 11–23.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Poirel, L., and Woodford, N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 59(2): 165-174.
- Lucet, J.C., Decré, D., Fichelle, A., Joly-Guillou, M.L., Pernet, M., Deblangy, C., Kosmann, M.J., and Regnier, B. 1999. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin Infect Dis.* 29: 1411–1418.
- Luvsansharav, U.O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Moriyama, T., and Yamamoto, Y. 2011. Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan. *J Infect Chemother.* 17(5): 722–725.
- Massova, I., and Mobashery, S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1-17.
- Masterton, R., Drusano, G., Paterson, D.L., and Park, G. 2003. Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections-the clinical challenges. *J Hosp Infect.* 55: 1–12.
- 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.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frere, J.M. 1998. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J.* 330(2): 581-598.
- Matthew, M., Hedges, R.W., and Smith, J.T. 1979. Types of β -lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 138(3): 657-662.
- Mayer, K., Opal, S., and Medeiros, A. 2000. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Churchill Livingstone. 2: 236-253.
- Medeiros, A.A. 1984. β -lactamases. *Bnt. Med. Buli.* 40: 18-27.

- Mendonça, N., Ferreira, E., Louro, D., Caniça, M., and ARSIP Participants. 2009. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*. 34: 29–37.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.D., and Timinouni, M. 2011. Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol. (Paris)*. 59: e73-e78.
- Mesko Meglic, K., Koren, S., Palepou, M.F., Karisik, E., Livermore, D.M., Pike, R., Andlovic, A., Jeverica, S., Krizan-Hergouth, V., Müller-Premru, M., Seme, K., and Woodford, N. 2009. Nationwide survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(1): 287–791.
- Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., Arlet, G., and Bakour, R. 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol. (Paris)*. 56: 319-325.
- Naas, T., Lezzar, A., Bentchouala, C., Smati, F., Scheftel, J.M., Monteil, H., and Nordmann, P. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 56: 439-440.
- Naiemi, N.A., Duim, B., Savelkoul, P.H., Spanjaard, L., De Jonge, E., Bart, A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and de Jong, M.D. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol.* 43(9): 4862-4864.
- Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., Hosaka, Y., and Inoue, M. 2004. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1151-1158.
- Nanninga, N. 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 5: 791-795.
- Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., and Timinouni, M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med. Mal Infect.* 42: 20-29.
- Neuwirth, C., Siebor, E., Duez, J.M., Péchinot, A., and Kazmierczak, A. 1995. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother.* 36(2): 335–342
- Nikaido, H. 2000. "Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets." *Clin Microbiol Infect.* 6: 22-26.

- Nüesch-Inderbinnen, M.T., Kayser, F.H., and Hächler, H. 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases en Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 943-949.
- Olowe, O.A., Grobbel, M., Büchter, B., Lübke-Becker, A., Fruth, A., and Wieler, L.H. 2010. Detection of *bla*(CTX-M-15) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* from hospital patients in Nigeria. *Int J Antimicrob Agents.* 35: 206-207.
- Olson, A.B., Silverman, M., Boyd, D.A., McGeer, A., Willey, B.M., Pong-Porter, V., Daneman, N., and Mulvey, M.R. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera Georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(5): 2112-2115.
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., and Farber, J.M. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J Food Protect.* 66 (3): 370-375.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., and Jacoby, G.A. 1990. Novel plasmid mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2200-2209.
- Patterson, J.E. 2001. Antibiotic utilization: is there an effect on antimicrobial resistance. *Chest.* 119: 426–30.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-686.
- Paterson, D.L., Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P.R., Woods, G.L., Satishchandran, V., Snyder, T.A., Harvey, C.M., Tepler, H., and DiNubile, M.J. 2005. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother.* 55 (6): 965.
- Pena, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Linares, J., Garrigosa, F., Ariza, J., and Gudiol, F. 1997. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect.* 35: 9–16.
- 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.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., and Bonomo, R.A. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 7: 459-469.
- Philippon, A., and Arlet, G. 2006. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin.* 64(1): 37-51.

- Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1-11.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K., and Poirel, L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended spectrum betalactamases (ESBL) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 56: 52–59.
- Podschun, R., and Ullmann, U. 1998. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 11: 589-603.
- Poirel, L., Kampfer, P., and Nordmann, P. 2002. Chromosome-encoded Ambler A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 4038-4040.
- Poirel, L., Lebessi, E., Castro, M., Fèvre, C., Foustoukou, M., and Nordmann, P. 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2277-2279.
- Poole, K. 2004. "Resistance to beta-lactam antibiotics." *Cell Mol Life Sci.* 61(17): 2200-2223.
- Rahal, K., Belouni, R., and Benslimani, A. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS. 4^{ème} édition. Algérie.* 46-52.
- Ramdani-Bouguessa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., and Canica, M. 2011. Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. *J Med Microbiol.* 60: 983-987.
- Ramdani-Bouguessa, N., Mendonca, N., Leitao, J., Ferreira, E., Tazir, M., and Canica, M. 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol.* 44: 4584-4586.
- Robin, F., Gibold, L., and Bonnet, R. 2012. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires.* 445 : 47-58.
- Rodriguez-Bano, J., Alcalá, J., Cisneros, J., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J.P., Tórtola, T., Mirelis, B., Navarro, G., Cuenca, M., Esteve, M., Peña, C., Llanos, A.C., Cantón, R., and Pascual A. 2008a. Community infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* 168(17): 1897–1902.
- Rodriguez-Bano, J., Lopez-Cerero, L., Navarro, M.D., Diaz de Alba, P., and Pascual, A. 2008b. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 62(5): 1142–1149.

- Rodriguez-Villalobos, H., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Deplano, A., Montesinos, I., de Mendonca, R., Jans, B., and Glupczynski, Y. 2011. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 66: 37-47.
- Rodriguez-Villalobos, H., and Struelens, M.J. 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* 15. (3): 205–213.
- Rubin, M.A., and Samore M.H. 2002. Antimicrobial Use and Resistance. *Curr Infect Dis Rep.* 4: 491-497.
- Ryan, K.J. 2004. Enterobacteriaceae. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases. USA: McGraw-Hill. 4th ed: 343-371.
- Sahly, H., Ancken, H., Benedi, V.J., Forestier, C., Fussing, V., Hansen, D.S, Ofek, I., and Podshun, R. 2004. Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 20-26.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis. T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2nd éd. 1: 1659.
- 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.
- Schwaber, M.J., and Carmeli, Y. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 60: 913-920.
- Schwarz, S., and Chaslus-Dancla, E. 2001. "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance." *Vet Res.* 32(3-4): 201-225.
- Severin, J.A., Mertaniasih, N.M., Kuntaman, K., Lestari, E.S., Purwanta, M., Lemmens-Den Toom, N., Duerink, D.O., Hadi, U., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Goessens, W.H. 2010. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Surabaya, Indonesia. *J Antimicrob Chemother.* 65(3): 465-469.
- Shu, J.C., Chia, J.H., Kuo, A.J., Su, L.H., and Wu, T.L. 2010. A 7-year surveillance for ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a university hospital in Taiwan: the increase of CTX-M-15 in the ICU. *Epidemiol Infect.* 138: 253-263.
- Sirot, J. 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 27(12): 2887-2890.

- Spratt, B.G., Zhang, Q.Y., Jones, D.M., Hutchison, A., Brannigan, J.A., and Dowson, C.G. 1989. Recruitment of a penicillin-binding protein in gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 86(22): 8988-8992.
- Stone, P.W., Gupta, A., Loughrey, R.N., Della-Latta, P.H., Cimiotti, R.N., Larson, E., Rubenstein, D., and 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. 24: 601-606.
- Stratton, C.W. 2000. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J*; 48:186-198.
- Stürenburg, E., and Dietrich, M. 2003. Extended spectrum beta- lactamases implication for the clinical microbiology, therapy, and infection control. *J infect*. 47: 273-295.
- Thomson, K.S., and Moland, E.S. 2000: the new β -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect*. 2: 1225–1235.
- Tobes, R., Codoñer, F.M., López-Camacho, E., Salanueva, I.J., Manrique, M., Brozynska, M., Gómez-Gilc, R., Martínez-Blanchb, J.F., Álvarez-Tejadod, M., Parejaa, E., and Mingorancec, J. 2013. Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* KpQ3, a DHA-1 β -Lactamase-Producing Nosocomial Isolate. *Genome Announc*. 1(1): e00167-12.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., and de Champs, C. 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. 27: 397-402.
- Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Madoux, J., Gharout, A., and de Champs, C. 2008. *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J Hosp Infect*. 68: 183-185.
- Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., Brasme, L., and de Champs, C. 2012. CTX-M-15- producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algeirs (Algeria). *Int Res J Microbiol*. 3: 181-185.
- Touati, A., Zenati, K., Brasme, L., Benallaoua, S., and de Champs, C. 2010. Extended-spectrum beta-lactamase characterisation and heavy metal resistance of Enterobacteriaceae strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect*. 75: 78-79.
- Valverde, A., Coque, T.M., García-San Miguel, L., Baquero, F., and Cantòn, R. 2008. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *Antimicrob. Agents Chemother*. 61: 64-72.

- Vander-Stichele, R.H., Elseviers, M.M., Ferech, M., Blot, S., Goossens, H., and European Surveillance of Antibiotic Consumption (ESAC) Project Group. 2006. "Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002)". *J Antimicrob Chemother.* 58(1): 159-167.
- Villegas, M.V., Kattan, J.N., Quinteros, M.G., and Casellas, J.M. 2008. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 14: 154–158.
- Vora, S., and Auckenthaler, R. 2009. Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique?. *Rev Med Suisse.* 5: 1991-1994.
- Walsh, C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology press. Washington.*
- Wiener, J., Quinn, J.P., Bradford, P.A., Goering, R.V., Nathan, C., Bush, K., and Weinstein, R.A. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA.* 281(6): 517–523.
- Weldhagen, G.F., Poirel, L., and Nordmann, P. 2003. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2385-2392.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., and Strynadka, N.C. 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 8: 525-533.
- Yoshimura, F., and Nikaido, H. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutés. *J Bacteriol.* 152(2): 636-642.
- Zogheib, E., and Dupont, H. 2005. Entérobactéries multirésistantes. *Elsevier SAS. Conférences d'actualisation.* 153-165.

Annexes

Annexe N°1 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (CA-SFM. 2010).

Familles d'Antibiotiques	Antibiotiques testés	Signes	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		Concentrations critiques (mg/L)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
β-lactamines	Céfalotine	CF	30µg	≥ 18	<12	≤8	>32
	Amoxicilline	AMX	25µg	≥ 21	<16	≤4	>8
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≥ 21	<16	≤4/2	>8/2
	Ticarcilline	TIC	75µg	≥ 24	<22	≤8	>16
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≥ 24	<22	≤8/2	>16/2
	Pipéracilline	PIP	75µg	≥ 20	<16	≤8	>16
	Pipéracilline/tazo bactam	TPZ	75/10µg	≥ 21	<17	≤8/4	>16/4
	Ceftazidime+ Ac-clavulanique	CAZ-CV	30/10µg	≥26	<19	≤1	>8
	Aztréonam	ATM	30µg	≥ 27	<21	≤ 1	>8
	Céfotaxime	CTX	30µg	≥26	<23	≤1	>2
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥26	<19	≤1	>8
	Céfépime	FEP	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Cépirome	CPO	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Céfixime	CFM	30µg	≥ 25	<22	≤ 1	>2
	Céfuroxime	CXM	30µg	≥22	<22	≤8	>8
	Céfoxitine	FOX	30µg	≥22	<15	≤8	>32
Imipenème	IPM	10µg	≥ 24	<17	≤ 2	>8	
Aminosides	Kanamycine	K	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Tobramycine	TM	10µg	≥18	<16	≤2	>4
	Amikacine	AN	30µg	≥17	<15	≤8	>16
	Gentamicine	GM	15µg	≥18	<16	≤2	>4

	Nétilmicine	NET	30µg	≥21	<19	≤2	>4
Quinolones – Fluoroquinolones	Ofloxacine	OFX	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ac.nalidixique	NA	30µg	≥20	<15	≤8	>16
Sulfamides- Triméthoprimes	Sulfamides	I	200µg	≥17	<12	≤64	>256
	Triméthoprim	TMP	5µg	≥20	<16	≤2	>4
	Triméthoprim/ Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75 µg	≥16	<13	≤2/38	>4/76
Divers	Chloramphénicol	C	30µg	≥23	<23	≤8	>8
	Tétracycline	TE	30µg	≥19	<17	≤4	>8
	Colistine	CS	50µg	≥15	<15	≤2	>2
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥14	<14	≤32	>32

Annexe N°2 : Gel d'acrylamide et gel d'iode pour Isoélectrofocalisation.

1- Gel d'acrylamide :

Acrylamide : 4,70 ml

Ampholines : 1,9 ml

Ammonium peroxodisulphate : 0,175 ml

TEMED : 0,025 ml (TetraMéthylEthylèneDiamine)

Eau distillée : 18,25 ml

2- Gel d'iode :

Dans un erlen de 200ml ;

Agar : 1,05g

Amidon : 0,35g

Tampon A 27,44 ml (Peser 9,072g de KH_2PO_4 dans un 1 litre d'eau distillée).

Tampon B 42,56 ml (Peser 11,866g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans un 1 litre d'eau distillée)

Iode : 2,1ml

Antibiotique (la Pénicilline) : 1 ml

Annexe N°3 : Solutions, tampons et gels pour PCR et ERIC-PCR.

1- Tampon 5X :

Réf : M792A

Promega

2- TBE :

Réf : ET020-C

Euromedex

3- TBE 0,5X :

Faire une dilution au 1/20 ème du TBE10X (50ml de TBE10X dans 950 ml d'eau distillée)

4- Gel d'agarose à 1% :

0,7g d'agarose dans un volume de 70 ml de TBE0,5X

5- Gel d'agarose à 1,5% :

1,05 g d'agarose dans un volume de 70 ml de TBE0,5X

Annexe N°4 : Solutions et tampons pour l'extraction de l'ADN plasmidique.

1- TAE10X :

Réf : EU0202

Euromedex

2- TAE1X :

Pour 1 litre, diluer au dixième la solution mère TAE10X dans de l'eau distillée.

3- TAE 0,5X :

Pour 1 litre, diluer au vingtième la solution mère TAE10X.

4- Solution de lyse :

Pour 100 ml,

SDS : 3%	3g
Tris base : 50mM	0,6g
NaOH 2N : Ph 12,6	1,6 ml
Eau distillée	qsp 100 ml

Après dissolution filtrer sur membrane Millipore 0,45 micron.

Cette solution se garde à température ambiante