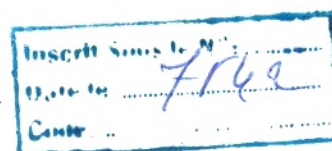


République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Option : contrôle de développement microbien

Thème :

**Profils de résistance aux  $\beta$ -lactamines de souches  
communautaires d'*Escherichia coli***

Présenté par :

**Melle MILOUDI Amaria**

Devant le jury composé de

Mme BOUCHERIT Z

Professeur

Président

Mme HASSAINE H

Professeur

Examinatrice

Mme KAZI TANI Z

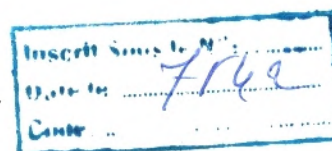
Maitre assistant A

Promoteur

*Année universitaire : 2013-2014*

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**

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie**

Option : contrôle de développement microbien

Thème :

**Profils de résistance aux  $\beta$ -lactamines de souches  
communautaires d'*Escherichia coli***

Présenté par :

**Melle MILOUDI Amaria**

Devant le jury composé de

Mme BOUCHERIT Z

Professeur

Président

Mme HASSAINE H

Professeur

Examinatrice

Mme KAZI TANI Z

Maitre assistant A

Promoteur

*Année universitaire : 2013-2014*

## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon promoteur Mme KAZI TANI Z. maitre assistant A à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique, et ses prodigieux conseils, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien.*

*Mes remerciements s'adressent également à*

*Mme BOUCHERIT Z. Maitre de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*Mme HASSAINE H. Maitre de Conférences de Classe A à l'Université de Tlemcen, je la remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail. Et de m'avoir accueillir au niveau de son laboratoire.*

*Je tiens à remercier aussi*

*Les techniciens du «Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédicale et à l'Environnement».*



## ***DEDICACES***

*Je dédie cet humble travail*

*A*

***ALLAH** le tout puissant à qui je dois tout.*

*Mes très chers parents*

*Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans faille*

*Mon fiancé Tayeb, pour leur aide et encouragement sans cesse*

*Mes frères et sœurs, Ismail, Miloud, Kheira, Hanane, Hadjer, et toute ma famille*

*Mes amis Fatima, Amaria, Asma, khadidja, Nacira, Nabila, Chahra, Lila, Wahiba,*

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b><i>Synthèse bibliographique</i></b>	
<b>1. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>02</b>
1.1. Caractères Morphologiques et culturaux .....	02
1.2. Caractères biochimiques.....	02
1.3. Habitat.....	02
1.4. Caractères antigéniques.....	02
1.5. Pouvoir pathogène.....	03
<b>2. <math>\beta</math>- lactamines.....</b>	<b>03</b>
2.1. Définition.....	03
2.2. Classification des $\beta$ -lactamines .....	03
2.3. Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....	05
<b>3. La résistance d'<i>Escherichia coli</i> aux <math>\beta</math>- lactamines.....</b>	<b>05</b>
3.1. Mécanismes non enzymatiques.....	06
3.2. Mécanismes enzymatiques.....	07
<b><i>Matériel et Méthodes</i></b>	
<b>1. Matériel.....</b>	<b>13</b>
1.1. Souches bactériennes.....	13
1.2. Test biochimique.....	13
1.3. Les antibiotiques ( $\beta$ -lactamines).....	13
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>13</b>
2.1. Isolement et purification.....	13

2.2. Identification.....	13
2.3. Antibiogramme.....	14
2.4. Test de synergie.....	15

***Résultats et discussion***

1. Isolement et identification.....	17
2. Résistance d' <i>E.coli</i> aux $\beta$ -lactamines.....	17
3. Phénotypes de résistance d' <i>E.coli</i> aux $\beta$ -lactamines.....	17

<b><i>Conclusion</i></b> .....	20
--------------------------------	----

<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	22
---	----

<b><i>Annexes</i></b> .....	28
-----------------------------	----

# Introduction

La résistance des bactéries aux antibiotiques reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu communautaire où *E. coli* est l'exemple des espèces les plus fréquemment isolées. Cette bactérie commensale du tube digestif est le germe préférentiel des infections urinaires. L'incidence de ces infections est plus marquée chez les personnes de sexe féminin en milieu communautaire **(Mirabaud., 2003)**. Le terme d'infection urinaire dans la communauté regroupe des situations cliniques hétérogènes qui ont comme caractéristique commune la présence de quantités significatives de bactéries dans les urines **(Wagenlehner., 2006)**.

La présence de mécanismes de résistance divers explique les difficultés dans les traitements antibiotiques des infections communautaires. Pour *E. coli*, le mécanisme montrant l'augmentation la plus forte est la présence de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) de type CTX-M **(Brement., 2009)**. Ces enzymes sont connue comme une cause importante d'apparition des infections des voies urinaires communautaires et cela a été appelé CTX-M pandémie **(Peirano et al., 2010)**.

L'objectif de notre travail est de déterminer les profils de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'*E. coli* isolées en milieu communautaire et de rechercher la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi.



# Synthèse bibliographique

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* a été isolée pour la première fois par Escherich, en 1885 dans les selles d'un nourrisson. En 1891 Achard précisa que la bactérie pyogène, décrite trois ans plus tôt par Albarran dans les urines purulentes, devait être identifiée au colibacille (**Robert, 1974**).

#### 1.1. Caractères morphologiques et culturels

*E. coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4  $\mu$  de long sur 0,4 à 0,6  $\mu$  de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, donne sur gélose ordinaire des colonies lisses, brillantes et homogènes (**Lobril, 1998**). Il peut se multiplier à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5 (**Leclerc, 1993**).

#### 1.2. Caractères biochimiques

*E. coli* fermente le glucose et le lactose, avec production de gaz, il forme de l'indole en eau peptonée, il donne lieu à une réaction de Voges-Proskauer négative, il ne se contente pas de citrate comme seule source de carbone, il possède une lysine-décarboxylase, mais ni de tryptophane-désaminase ni d'uréase, sa culture est inhibée par le cyanure de mercure. Sa culture ne donne pas lieu à la formation d'hydrogène sulfuré (**Robert, 1974**).

#### 1.3. Habitat

*E. coli* est un hôte normal du tube digestif, de la partie distale de l'iléon et du colon qu'il colonise dès les premières heures après la naissance de l'homme et des animaux à sang chaud. L'appellation commune « colibacille » est une contraction de « bacille du colon » rappelant son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'homme cette bactérie représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie ( $10^7$  à  $10^8$  UFC/gr de selle chez l'adulte) (**Finegold et al., 1983**).

#### 1.4. Caractères antigéniques

*E. coli* possède des antigènes somatiques O associés aux lipopolysaccharides de la paroi qui ont une variabilité permettant de décrire au moins 164 spécificités ; des antigènes flagellaires H qui sont associés aux protéines des flagelles dont l'identification permet de déterminer le sérotype d'une souche de colibacille, et des antigènes d'enveloppe K, qui sont de nature

polysaccharidiques et sont inégalement répartis dans l'espèce. Certains constituent une véritable capsule semblable à celle des *Klebsiella* (Bernard et Alain, 2002).

### 1.5. Pouvoir pathogène

*E. coli* est responsable d'infections diverses telles que les infections extra intestinales représentées par des infections urinaires surtout chez les femmes, des infections abdominales, des infections méningée, mais aussi d'infections intestinales telles que les diarrhées infectieuses qui peuvent revêtir des formes différentes en fonction des facteurs de virulence hébergés par ces souches (Avril *et al.*, 2002). *E. coli* est également l'espèce bactérienne la plus souvent identifiée dans les bactériuries communautaires (Prère *et al.*, 2004).

## 2. Les $\beta$ lactamines

### 2.1. Définition

Les  $\beta$  lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique (Cavallo *et al.*, 2004).

### 2.2. Classification

La structure du noyau de base, qui comporte toujours le cycle  $\beta$ -lactame, permet de répartir ces produits en différents groupes (Cavallo *et al.*, 2004). On distingue les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (figure 1).

#### 2.2.1. Pénames (ou pénicillines)

Il s'agit d'une vaste famille de produits ayant en commun le noyau Péname qui est caractérisé par un pentacycle saturé associé au noyau  $\beta$ -lactame. Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6 (Cavallo *et al.*, 2004). Selon la nature des chaînes latérales, on distingue : les pénicillines G, les pénicillines M et les pénicillines A (Chaabane *et al.*, 2009).



### 2.2.2. Céphèmes (ou céphalosporines)

La structure chimique de base des céphalosporines est constituée d'un noyau  $\beta$ -lactame et d'un noyau dihydrothiazine ou acide 7-aminocéphalosporanique. Par rapport au cycle thiazolidine ou acide 6-aminopénicillanique des pénicillines, ce noyau possède un carbone supplémentaire (**Faure, 2008**). Leur classification repose sur leur spectre d'activité de plus en plus large que sur leur structure chimique commune (**Toure, 2004**). On distingue : les céphalosporines de première génération (céfalotine), deuxième génération (céfuroxime), troisième génération (céfotaxime) et de quatrième génération (céfépime) (**Mouton et al., 2000**).

### 2.2.3. Carbapénèmes ou Pénèmes

Les Carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénèmes) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3, également présente sur les céphalosporines (**Wolff et al., 2009**). Elles sont subdivisées en quatre groupes : imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème (**Cavallo et al, 2004**).

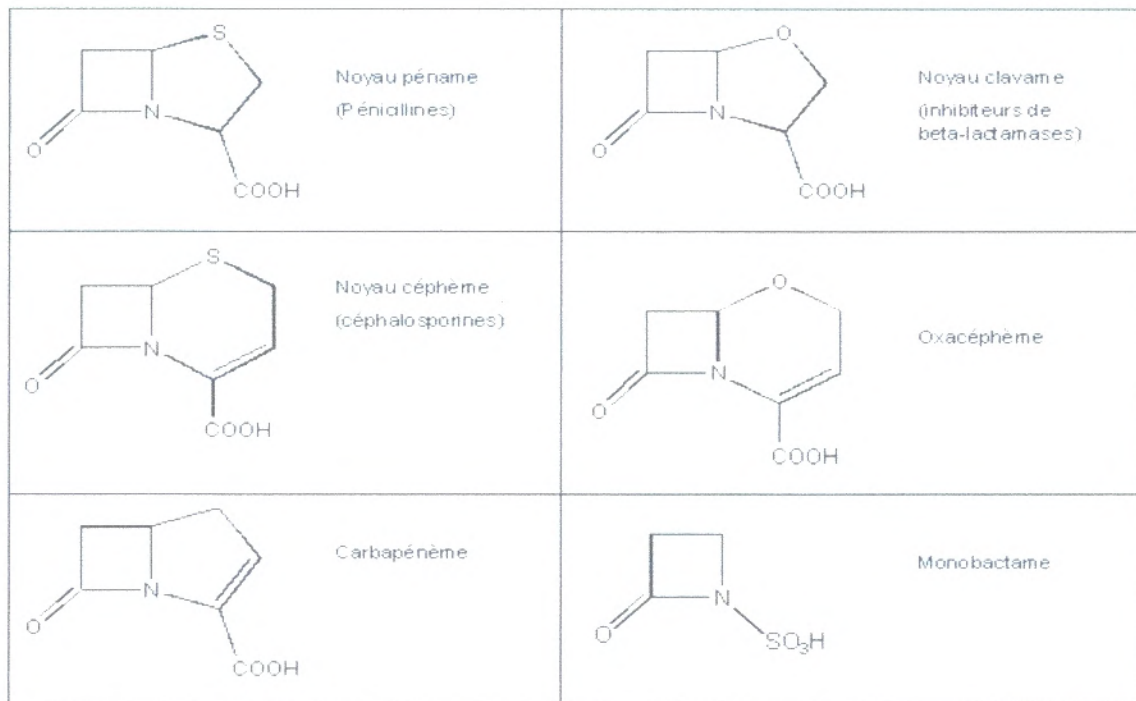
### 2.2.4. Monobactames

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle  $\beta$ -lactame. Seul l'aztréonam est prescrit (**Cavallo et al, 2004**).

### 2.2.5. Inhibiteurs des $\beta$ -lactamases

Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases possèdent une faible activité antibactérienne intrinsèque. En se liant à la  $\beta$ -lactamase, ils permettent l'activité de la  $\beta$ -lactamine à laquelle ils sont associés. Il en résulte une action synergique et une augmentation de l'activité de la  $\beta$ -lactamine. Les plus utilisés sont l'acide clavulanique et le tazobactam (**Andre et al., 1998**).





**Figure 1** : Diversité des antibiotiques de type  $\beta$ -lactames : principaux cycles et antibiotiques représentatifs (Tulkens *et al.*, 2002).

### 2.3. Mécanisme d'action

Les  $\beta$ -lactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les cibles des  $\beta$ -lactamines sont les PLP (protéines de liaison à la pénicilline) qui interviennent dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne (Tipper, 1985). En effet, le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes de glycanes reliées par des peptides. Ses précurseurs sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Perronne *et al.*, 1999). Les  $\beta$ -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle  $\beta$ -lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent, ce qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004).

### 3. La résistance d'*Escherichia coli* aux $\beta$ -lactamines

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. La résistance aux antibiotiques n'est pas seulement un

problème microbiologique lié à la bactérie mais prend également en compte des aspects pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et cliniques (**Poole, 2004**).

La bactérie peut opposer un ou plusieurs moyens de défense pour échapper à l'action d'antibiotique. S'ils sont exprimés à l'état naturel chez toutes les bactéries d'une espèce, on parle de résistance naturelle, s'ils sont exprimés uniquement par certaines bactéries de l'espèce on parle de résistance acquise (**Cavallo et al., 2004**).

### 3.1. Mécanismes non enzymatiques

#### 3.1.1. Imperméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif

Pour atteindre leurs cibles situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les  $\beta$ -lactamines doivent diffuser aux travers de canaux spécialisés appelés porines. La diffusion est fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules (**Nicaïdo, 2000**). La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Livermore et al., 1996**). Deux porines principales sont présentes chez *E. coli* : OmpF et OmpC. Chez les mutants de *E. coli* déficients en OmpC, la pénétration des  $\beta$ -lactamines est assurée par la porine OmpF, qui est suffisamment large, et il n'y a pas d'augmentation de la résistance. Au contraire, pour les mutants déficients en OmpF, les CMI des différentes  $\beta$ -lactamines sont augmentées pour les molécules les plus volumineuses car la porine OmpC est plus étroite, quant aux mutants OmpF<sup>-</sup> OmpC<sup>-</sup>, leurs CMI sont augmentées d'une manière très importante (**Jaffe et al., 1982**).

#### 3.1.2. Modification de la cible des $\beta$ -lactamines (PLP)

Ces résistances font suite à des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour les PLP normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant pour des PLP ayant peu d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. On peut ainsi aboutir à des altérations quantitatives et qualitatives des PLP, avec diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines, ou à une substitution dans leurs fonctions des PLP cibles par une autre PLP moins affine (**Cavallo et al., 2004**). Le rôle des PLP dans la résistance bactérienne intrinsèque a été mis en évidence chez des mutants de *E. coli* qui avaient une résistance augmentée au mécillinaam et à l'imipénème due à une



diminution de l'affinité des PLP-2 pour ces antibiotiques alors que les mutations touchant la PLP-3 s'accompagnaient d'une résistance vis-à-vis des céphalosporines (Spratt, 1983).

### 3.1.3. Expression d'une pompe d'efflux actif

L'hyperexpression de système d'efflux chez les entérobactéries fait souvent suite à des mutations survenant dans les gènes répresseurs qui régulent la transcription de tous ces systèmes transporteurs comme par exemple chez *E. coli*, l'hyperproduction de l'activateur transcriptionnel MarA (multiple antibiotic resistance), qui résulte de la mutation du répresseur *marA*, est capable à la fois de diminuer la porine OmpF en diminuant la traduction du gène *ompF* et de stimuler l'expression de nombreux gènes dont certains codent pour des pompes d'efflux actif comme le système AcrAB (Nikaido H *et al.*, 1998). Ces systèmes d'efflux sont surtout actifs sur les  $\beta$ -lactamines les plus hydrophobes qui ne passent pas la barrière de la membrane cytoplasmique et s'accumulent dans l'espace périplasmique (Mazzariol *et al.*, 2000). L'acquisition ou la surproduction de pompes à efflux peuvent expulser les  $\beta$ -lactamines hors de la bactérie même contre le gradient de concentration (Poole K, 2005).

### 3.2. Mécanismes enzymatiques : les $\beta$ -lactamases

La première  $\beta$ -lactamase, une céphalosporinase chromosomique, a été identifiée chez *E. coli* avant même que la pénicilline ne soit utilisée en milieu médical (Abraham, 1940). L'utilisation massive des antibiotiques en thérapeutique humaine et vétérinaire confère à ces espèces un avantage sélectif favorisant leur émergence et la dissémination de leur matériel génétique. Les  $\beta$ -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (Arlet et philippon, 2006). Ils hydrolysent le pont amide du cycle  $\beta$ -lactame pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (Barrial *et al.*, 2006) (figure 2).

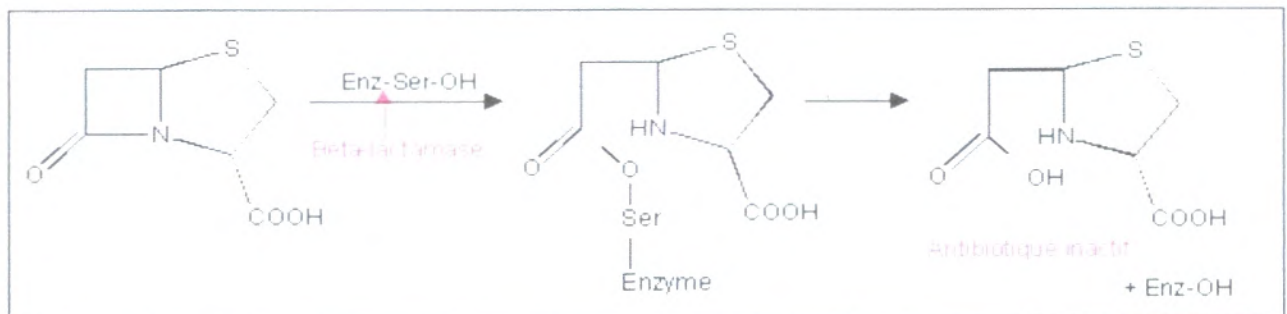


Figure 2. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Barrial *et al.*, 2006)

Parmi les nombreuses classifications de  $\beta$ -lactamases proposées, la plus utilisée est la classification structurale de Ambler (**Ambler, 1980**). Elle divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (A à D), qui présentent des différences sur le plan phylogénétique. Les  $\beta$ -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acétylation au cours de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo- $\beta$ -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (**Bibbal, 2008**).

### 3.2.1. Classe A

Elle était principalement représentée par les pénicillinases. Comme leur nom l'indique, ces enzymes sont principalement actives sur les pénicillines mais aussi, à un moindre degré sur les céphalosporines de première génération. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs suicides utilisés en médecine (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam). Les principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV, CTX-M et KPC (**Bibbal, 2008**).

### 3.2.2. Classe B

L'importance clinique des métallo- $\beta$ -lactamases est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des  $\beta$ -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- $\beta$ -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs suicides classiques (**Bebrone, 2007**). Les principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases de type VIM et NDM (**Payal et al., 2010**).

### 3.2.3. Classe C

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. Ces enzymes sont résistantes à l'acide clavulanique (**Philippon et al., 2002**). Les principaux représentants de ce groupe sont les  $\beta$ -lactamases de type CMY et DHA (**Barrial et Scotet, 2006**).

### 3.2.4. Classe D

Elle regroupe les Oxacillinases qui sont des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent l'oxacilline et ses dérivés et qui sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique (**Paterson et Bonomo, 2005**).



Le principal représentant de ce groupe est la  $\beta$ -lactamase de type OXA-48 (Carrer *et al.*, 2010).

# Matériel et Méthodes

## 1. Matériel

### 1.1. Souches bactériennes

8 souches d'*E.coli* isolées en milieu communautaire nous ont été fournies par les laboratoires d'analyses médicales privés « Ghomri » et « Benhamidate ».

### 1.2. Test biochimique

Galerie API 20 E (Bio Mérieux)

### 1.3. Les antibiotiques ( $\beta$ -lactamines)

Ampicilline (10  $\mu$ g), Ticarcilline (75  $\mu$ g), Imipenème (10  $\mu$ g), Céfalotine (30  $\mu$ g), Céfoxitine (30  $\mu$ g), Céftrizidime (30  $\mu$ g), Céftriaxone (30  $\mu$ g).

## 2. Méthodes

### 2.1. Isolement et purification

L'ensemencement des souches d'*E.coli* a été réalisé sur milieu Mac-Conkey puis incubé à 37°C pendant 24h. La purification des colonies bactériennes par ré-isolement sur le même milieu a été effectuée afin d'obtenir des souches pures à identifier.

### 2.2. Identification

#### 2.2.1. Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

#### 2.2.2. Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :

- pour les tests CIT , VP et GEL , remplir tube et cupule,
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H2S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

### 2.2.3. Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
  - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
  - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
  - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

## 2.3. Antibiogramme (CA-SFM., 2013)

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, selon les recommandations du CA-SFM.

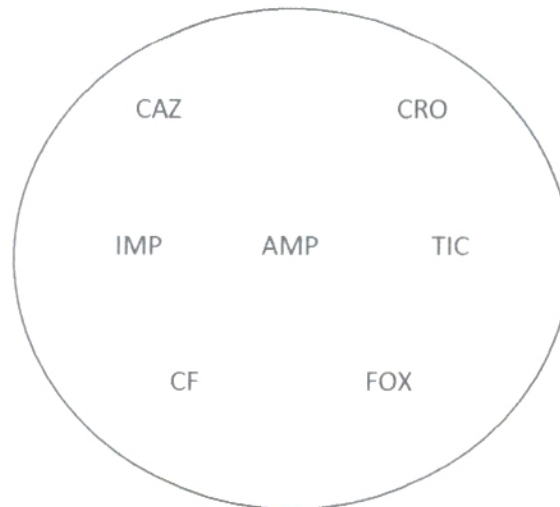
### 2.3.1. Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture bactérienne de 24h sur milieu gélosé, réaliser une suspension en ensemençant une colonie dans 5mL d'eau physiologique.
- Calibrer la densité optique (DO) de la culture obtenue à une DO de 0,08-0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à  $10^8$  UFC/mL.
- ensemencer par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon sur la gélose Mueller Hinton.

### 2.3.2. Application des disques

Les disques d'antibiotiques sont appliqués sur les boîtes de Pétri à l'aide d'une pince stérile. Pour les  $\beta$ -lactamines, l'application des disques suit le schéma de Vedel.





**Figure 1. Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel (Vedel, 2005)**

### **2.3.3. Lecture**

Après 24 heures d'incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés afin de déterminer les catégories cliniques selon les valeurs critiques.

## **2.4. Test de synergie (Philippon et Arlet, 2006).**

### **2.4.1. Principe**

La démonstration phénotypique de la présence de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi sera réalisée par la mise en évidence d'une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique.

### **2.4.2. Technique**

La technique consiste à appliquer sur une gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (250  $\mu$ g/ml), préalablement ensemencée par la souche à tester, un disque de ceftazidime (CAZ) et/ ou de céfépime (FEP) et un disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC), distant 1,5cm.

### **2.4.3. Lecture**

Si il y a présence de BLSE, la synergie est visible entre les disques FEP et/ou CAZ et TCC.

# Résultats et discussion

### 1. Isolement et identification

L'identification par galerie API 20 E nous a permis de confirmer l'appartenance des souches au genre espèce *Escherichia coli* (figure 3). Ces souches ont été toutes isolées à partir d'urines chez des malades consultant en milieu communautaire.



**Figure 3.** Identification par galerie API 20E

### 2. Résistance d'*E.coli* aux $\beta$ -lactamines

L'étude de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines a montré que toutes les souches étaient résistantes à l'ampicilline, 5 d'entre elles (B2, B4, B6, G714, G1034) présentaient des résistances associées à la ticarcilline, à la céphalotine, à la céfoxitine et à la ceftazidime. Deux souches seulement (B2, B6) présentaient une résistance intermédiaire à la ceftriaxone. Cependant toutes les souches étaient sensibles à l'imipénème.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les souches étudiées est probablement liée à l'utilisation non contrôlée de ces molécules en milieu communautaire.

### 3. Phénotypes de résistance d'*E.coli* aux $\beta$ -lactamines

Chaque mécanisme de résistance donne un profil d'antibiogramme (phénotype) bien spécifique. En effet, en utilisant des antibiotiques d'une même famille comme marqueurs de détection phénotypique, on peut suspecter le ou les mécanismes de résistance produits par une bactérie (Vedel, 2005).

L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines d'*E.coli* isolées en milieu communautaire montre un phénotype pénicillinase associée à une céphalosporinase pour 5 souches. Ce phénotype est caractérisé par la résistance aux pénicillines (ampicilline et ticarcilline), aux céphalosporines de deuxième génération (céfoxitine) et troisième génération (ceftazidime). Aucune souche n'a montré une image de synergie entre les C3G et l'acide clavulanique ce qui traduit l'absence de BLSE. Le reste des souches (3 souches) présente un phénotype sauvage qui ne détermine aucune résistance acquise (Tableau 1).

**Tableau 1** : Lecture interprétative de l'antibiogramme

antibiotiques souches	IPM	TIC	FOX	AMP	CRO	KF	CAZ	Phénotype
B1 (7044552)	30 (S)	26 (S)	25 (S)	15 (R)	34(S)	21 (S)	25 (S)	Sauvage
B2 (7044552)	31 (S)	(R)	10 (R)	(R)	25 (I)	(R)	(R)	Pase + Case
B3 (7044552)	31 (S)	29 (S)	25 (S)	15 (R)	30 (S)	20 (S)	24 (S)	Sauvage
B4 (7044552)	30 (S)	(R)	17 (I)	(R)	30 (S)	12 (I)	17 (R)	Pase + Case
B5 (7044552)	33 (S)	28 (S)	28 (S)	17 (I)	35 (S)	20 (S)	25 (S)	Sauvage
B6 (7044552)	26 (S)	(R)	19 (I)	(R)	25 (I)	14 (I)	13 (R)	Pase + Case
G714 (7044552)	31 (S)	(R)	19 (I)	(R)	31 (S)	12(I)	16 (R)	Pase + Case
G1034 (7044552)	28 (S)	(R)	23 (I)	(R)	29 (S)	12(I)	15 (R)	Pase + Case

Les *E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M ont été rapportées au niveau du CHU de Tlemcen par **Baba Ahmed et al., 2012**. Cependant aucune donnée n'est disponible en milieu communautaire. Les seules études décrivant la présence des BLSE chez des souches d'*E.coli* isolées en milieu communautaires en Algérie, sont ceux de l'équipe de Béjaia (**Touati et al., 2012**).

Par ailleurs, aucune des souches testées ne présente de résistance à l'imipénème. Cet antibiotique peut être considéré comme molécule de choix dans le traitement des infections à *E.coli* (**Guessennd et al., 2008**).



# Conclusion

## Conclusion

---

L'augmentation croissante de la résistance des souches communautaires d'*E. coli* aux  $\beta$ -lactamines nous amène à plusieurs réflexions concernant la prise en charge des patients consultant pour infection urinaire. Cette bactérie est caractérisée par une aptitude particulière à acquérir des mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines. Le principal mécanisme de résistance est la production de  $\beta$ -lactamases, enzymes qui hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame et rendent donc la bactérie résistante à certaines  $\beta$ -lactamines (**Lavigne et al., 2002**).

D'après les résultats de ce travail, l'analyse phénotypique de la résistance des souches d'*E.coli* aux  $\beta$ -lactamine est en faveur d'une production de pénicillinase et de céphalosporinase pour 5 souches et d'un phénotype sauvage présenté chez par 3 souches.

Par ailleurs la diffusion communautaire d'*E.coli* sécréteur de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi de type CTX-M est d'ores et déjà une préoccupation majeure. Ce phénomène épidémique est particulièrement inquiétant par la rapidité de sa diffusion et son étendue géographique. La maîtrise du risque passe par la mise en place et le respect des mesures d'hygiène et la maîtrise de la prescription antibiotique (**Zahar et al., 2009**)

# Références bibliographiques

1. **Abraham EP., Chain E. (1940).** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146- 837.
2. **Ambler RP. (1980).** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 289: 321-31.
3. **Andre MH., Lortholary O., Bryskier A. (1998).** Classification des antibiotiques : relation-structure-activité. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine.* 5-0015. P6.
4. **Avril JL., Fauchère JL. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. 239-240.
5. **Baba Ahmed Z., Ayad A., Mesli E., Messai Y., Bakour R., Drissi M. (2012).** CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *Eastern Mediterranean Health Journal.* 40 : 382-386
6. **Barrial K., Scotet J. (2006).** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif : Perspectives d'évolution ; DES Bactériologie. 2.
7. **Bebrone C. (2007).** Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *BiochemPharmacol.* 74:1686-701.
8. **Bernard J., Alain R. (2002).** Les entérobactéries. Ed Lavoisier. 28-29.
9. **Bibbal D. (2008).** Impact des  $\beta$ -lactamines sur l'émergence d'Entérobactéries résistantes dans la flore digestive chez le porc : caractérisation et stratégie de prévention. Thèse de doctorat. 29-32.
10. **CA SFM., 2013.** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
11. **Carrër A., Poirel L., Yilmaz M . (2010).** Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 1369-73.
12. **Cavallo JD., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).**  $\beta$ -lactamines. *EMC- Maladies Infectieuses.* 1 :129-202.



13. **Chaabane A., Aouam K., Boughattas NA. (2009).** Allergie aux  $\beta$ -lactamines: mythe et réalités. *Médecine et maladies infectieuses*. 39 : 278-287.
14. **Faure S. (2008).** Les quinolones et fluoroquinolones. *Actualités pharmaceutiques*. 447:41-43.
15. **Finegold SM., Sutter VL., Mathisen GE. (1983).** Normal indigenous flora. In: Hentges D.J. *Human intestinal microflora in health and disease*. Academic Press. Inc. New York. 3-31.
16. **Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou-NDouba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M., Courvallin P. (2008).** Résistance aux quinolones de types qnr chez les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi à Abidjan en cote d'Ivoire. *Pathologie. Biologie*. 56 : 439-446.
17. **Guillaume B. (2009).** Emergence des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) en milieu communautaire : impact sur la prise en charge des patients. thèse de doctorat. 08
18. **Jaffe A., Chabbert YA., Semonin O. (1982).** Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of  $\beta$ -lactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 22: 942-948.
19. **Lavigne JP., Sotto A., Merle C., Jourdan J., Soussy CJ., Sirot D.(2002).** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux  $\beta$ -lactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol*. 50 : 388-93.
20. **Leclerc H. (1993).** Les *E. coli* responsables de diarrhées. *Arch.fr.pédiatr*. 50 :57-67.
21. **Livermore D., Williams JD. (1996).**  $\beta$ -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins: 502-578.
22. **Lobril JR. (1998).** Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse Université de Lyon I, France. 42-77.

23. **Mazzariol A., Cornaglia G., Nikaido H. (2000).** Contribution of the Amp-C  $\beta$ -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *E. coli* K12 to  $\beta$ -lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 :1387–1390.
24. **Mirabaud. (2003).** Entérobactéries à  $\beta$ -lactamases à spectre élargi en pédiatrie. thèse de doctorat. 2.
25. **Mouton Y., Bingen E., Deboscker Y. (2000).** Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. Ed John Libbey Eurotext. 45-50.
26. **Nikaido H., Basina M., Nguyen V. (1998).** Multidrug efflux pumps AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those  $\beta$ -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol.* 180: 4686–4692.
27. **Nikaido H. (2000).** Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clin Microbiol Infect.* 6: 22–26.
28. **Paterson DL., Bonomo RA. (2005).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18 : 657-86.
29. **Payal D., Camilla R., Anjali S et al. (2010).** New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: Treatment options with Carbapenems Compromised. *JAPI.* 58:147-149.
30. **Peirano G., van Greune C., Pitouta JD. (2010).** Molecular epidemiology of *E.coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4 *Int. J. Antimicrob. Agents.* 69: 449–453.
31. **Perronne C. (1999).** Maladies infectieuses. Ed Doin. Paris.65.
32. **Philippon A., Arlet G., Jacoby GA. (2002).** Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 46 : 1-11.
33. **Philippon A., Arlet G. (2006).**  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de biologie clinique.* 64 (1): 37-51.

34. **Poole K. (2004).** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 61: 2200-23.
35. **Poole K. (2005).** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56: 20-51.
36. **Prère MF., Licznar P., Decramer S., Fayet O. (2004).** *E. coli* from urinary tract infections and acute pyelonephritis of children: 1% of strains are resistant to a subset of third generation cephalosporins. *Pathologie Biologie.* 52: 497–500.
37. **Robert F. (1974).** *Élément de bactériologie médicale.* Ed Flammarion. 131.
38. **Spratt BG. (1983).** Penicillin binding Proteins and the future of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 129 : 1247-1260.
39. **Tipper DJ. (1985).** Mode of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther.* 27:1- 35.
40. **Touati A., Gharout-saiti A., Benallaoua S., Guillard T., Brasme L., Madoux J., and De champs C. (2012).** CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *African Journal of Microbiology Research.* 6(25) : 5306-5313.
41. **Toure F. (2004).** Résistance aux  $\beta$ -lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A. LE DANTEC. Thèse de doctorat. 29-40.
42. **Tulkens P., Spinewine A. (2002).** *Pharmacologie spéciale-Les aminoglycosides.* Pharmacologie et pharmacothérapie des anti-infectieux. Université catholique de Louvain.
43. **Vedel G. (2005).** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 56(4): 657-664.
44. **Wagenlehner F., Naber K. (2006).** Treatment of Bacterial Urinary Tract Infections: Presence and Future. *Eur. Urol.* 49: 235-244.
45. **Wolff M., Joly-Guillou ML., Pajot O. (2009).** Les carbapénèmes. *Réanimation.* 18 :199-208.

46. Zahar J., Bille E., Schnell D., Lanternier F., Mechai F., Masse V., Nassif X., Lortholary O. (2009). Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi. *Medecine Sciences*. 25 :939-44.



# Annexes

Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20E

Tests	Substrats	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- $\beta$ -galactoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine	Jaune	Rouge-orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-orangé
<u>CIT</u>	Trisodium citrate	Utilisation citrate	Vert pale	Bleu-vert
<u>H2S</u>	Sodium thiosulfate	Production de H2S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir
<u>URE</u>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indol	Incolore-vert pale-jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoine	Incolore-rose pale	Rose-rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Non diffusion	Noir
GLU	D-glucose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-mannitol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-mélobiose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygladine	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune





**Annexe 3. Concentrations et diamètres critiques des antibiotiques utilisés (CASFM, 2013)**

Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
			S	R	S	R
Ampicilline	AMP	10µg	≤ 4	> 8	≥ 19	< 16
Ticarcilline	TIC	75µg	≤ 8	16	≥ 24	< 22
Céfotitine	Fox	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Ceftriaxone	CRO	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Céfalotine	KF	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤ 1	> 4	≥ 26	< 21
Imipénème	IMP	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17



## ملخص

إشريشيا كولي تمثل الكائن الأكثر وجودا في الأمراض المعدية في المجتمع. تحليل ظواهر المقاومة للمضادات الحيوية بيئا لاكتامين لثمانية سلالات لإشريشيا كولي المعزولة من المجتمع يدل على الكشف عن بنسيليناز مرتبطة النمط الظاهري بسيفالوسبوريناز، هذا فيما يخص خمسة سلالات. يتميز هذا النمط الظاهري بمقاومته للبنسيلين (الأمبيسيلين وتيركاسيلين) والسيفالوسبورينات من الجيل الثاني (سيفوكسيتين) والجيل الثالث (سيفتازيديم). لا توجد سلالة تظهر صورة من التآزر بين C3G وحمض الكلافونيك هذا يعني عدم وجود BLSE. الثلاث سلالات المتبقية لديها النمط الظاهري من النوع البري الذي يتميز بعدم وجود أي مقاومة.

**كلمات مفتاحية:** إشريشيا كولي-الجماعة-بيئا لاكتامين-المقاومة-BLSE-النمط الظاهري.

## Résumé

*Escherichia coli* est le germe le plus fréquemment impliqué en pathologie infectieuse dans la communauté. L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de 08 souches d'*E.coli* isolées en milieu communautaire montre la détection d'un phénotype pénicillinase associée à une céphalosporinase pour 5 souches. Ce phénotype est caractérisé par la résistance aux pénicillines (ampicilline et ticarcilline), aux céphalosporines de deuxième génération (céfoxitine) et troisième génération (ceftazidime). Aucune souche n'a montré une image de synergie entre les C3G et l'acide clavulanique ce qui traduit l'absence de BLSE. Le reste des souches (3 souches) présente un phénotype sauvage qui ne détermine aucune résistance acquise.

**Mot clés :** *E.coli*- communautaire-  $\beta$ -lactamines-résistance-BLSE-phénotype.

## Summary

*Escherichia coli* is the organism most frequently involved in infectious diseases in the community. Analysis of the phenotypes of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics of 08 strains of *E. coli*. Isolated in the community shows the detection of penicillinase associated with cephalosporinase phenotype for five strains. This phenotype is characterized by resistance to penicillins (ampicillin and ticarcillin), the second-generation cephalosporins (cefotaxime) and third generation (ceftazidime). No strain did not show a picture of synergy between C3G and clavulanic acid reflecting the absence of ESBL. The remaining strains (3 strains) has a wild-type phenotype that determines any acquired resistance.

**Keyword:** *E.coli*-Community- $\beta$ -lactam -resistance-ESBL-phenotype